

ラット胎子膵島細胞の分化に関する研究

— 特に母体副腎皮質ホルモンによる影響 —

1998

小 松 克

# ラット胎子膵島細胞の分化に関する研究

—特に母体副腎皮質ホルモンによる影響—

1998

こまつ　　すぐる

小松　克

## 目次

	頁
緒言	1
第一章 膵島細胞の分化に関する光学および電子顕微鏡的研究	5
第一節 材料と方法	6
第二節 結果	8
第三節 考察	13
第四節 小括	17
第二章 膵島細胞の分化に対する母体副腎除去の影響	37
第一節 材料と方法	39
第二節 結果	41
第三節 考察	44
第四節 小括	48
第三章 ラット胎子膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの局在	64
第一節 材料と方法	66
第二節 結果	68
第三節 考察	72
第四節 小括	76
総括	85
謝辞	88
文献	89

## 緒言

ラットを含めた哺乳類の膵臓は前腸から膨出して形成される。ラット胎子の膵臓原基は、胎齢11日に腸管の背側から背側膵として、次いで腹側から腹側膵として出芽する (Hard, '44 ; Parsa et al., '69)。腹側膵は背方へ回り込み、背側膵と融合して1つの腺体を形成する。

膵臓内分泌部は外分泌部と同じ膵臓原基から分化する。一時期、発生途中で神経堤 (外胚葉) の細胞が膵臓へ移動して分化し、内分泌部を形成するという説が唱えられた時期があった (Pearse & Polak, '71)。その後、ラットの神経堤除去実験 (Pictet et al., '76) やウズラのキメラ作成系を用いた神経堤移植実験 (Fontaine & Le Dovarain, '77 ; Fontaine et al., '77) などにより、膵臓内分泌部が外胚葉由来という説はほぼ否定され、現在では膵臓内分泌部は外分泌部と同様、内胚葉由来と考えられている。

発達中の膵臓原基において、分泌管上皮細胞のうちいくつかは細胞分裂して2細胞となり、一方は内分泌細胞となってさらに分裂を続けて膵島原基を形成する。もう一方の細胞は分泌管に残り、また細胞分裂を行って膵島の細胞を補充する。膵島原基が形成し始めると、周囲の組織から間葉細胞が原基に侵入し、毛細血管網を形成し始める。しかしこの時はまだ膵島原基の細胞塊は分泌管の基底膜から外部へ出てはいない。しばらく細胞分裂と毛細血管の新生が進むと、膵島原基は分泌管の基底膜から離れ分泌管から独立したものとなる。これら一連の事象が次々に起き、多数の膵島原基が形成される。

高感度の免疫組織化学的手法の発達により、ラットを含めた多くの動物における膵島内分泌細胞が識別され、各々の細胞の出現時期が研究されてきた。Fuji ( '79) によると、ラットにおいてグルカゴン含有細胞が最も早く、

胎齡11日に膵臓原基に出現する。インシュリン含有細胞は胎齡14日に、そしてソマトスタチン含有細胞は胎齡17日に初めて膵島原基に認められるという。またYoshinari & Daikoku ('82)によると、グルカゴン含有細胞は胎齡11日、インシュリン含有細胞は胎齡12日、そしてソマトスタチン含有細胞は胎齡15日に出現する。これらの実験において、膵島ホルモン含有細胞の出現時期に若干の違いはあるが、ラットの膵島内分泌細胞は、グルカゴン含有細胞、インシュリン含有細胞、ソマトスタチン含有細胞の順に出現するようである。

胎齡が進むにつれて膵島の数も大きさも増加する (Pictet & Rutter, '72 ; Hellman, '59)。そして胎生末期から新生期にかけて各膵島細胞は著しく増加する。この時期の膵島および膵島細胞の成長パターンについては多くの研究がある (McEvoy & Madson, '80 ; McEvoy, '81 ; Kaung, '94)。胎生末期に向けて膵島細胞の増殖率が増加し、各膵島細胞は指数的に増加する。膵島細胞の増殖率は出生直前に最大となり、その後は漸減していくが、膵島細胞数、あるいは膵島体積は生後28日までは増加している (Kaung, '94)。

膵島細胞は胎生のかなり早い時期から出現し発育するようであるが、この膵島細胞の分化を調節する因子は本質的には分かっていない。McEvoy & Hegre ('76) は種々のステロイドホルモンを培養液に添加して胎齡20日のラット膵臓を器官培養し、培養液へ分泌されるアミラーゼおよびインシュリンを測定した。この実験において、性ステロイドは膵臓の外分泌および内分泌にはほとんど影響を示さなかったが、副腎ステロイドは膵臓の外分泌および内分泌の両者に大きく影響した。すなわち副腎ステロイドは培養膵臓のアミラーゼ分泌を刺激し、逆にインシュリン分泌を抑制した。さらにMcEvoy et al. ('76) は、げっ歯類の主要な副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンを培

養液に加えたところ、コルチコステロンは器官培養している胎齢20日の膵臓外分泌部の分化を促進するが、添加するホルモンの濃度によっては膵島の発育をも刺激すると報告した。この実験において、培養液にコルチコステロンを0.1mg/ml添加して胎子膵臓を器官培養すると膵島の発育は促進され、培養液へのインシュリン分泌は増加したが、1.0mg/mlあるいは10.0mg/mlの濃度の場合、膵島の発育は抑制され、培養液中に分泌されたインシュリン濃度も減少した。インシュリン分泌を促進するコルチコステロン濃度は、胎齢18日の膵島のグルカゴン陽性細胞からのグルカゴン分泌を抑制 (McEvoy, '80) し、そして胎齢22日 (本研究における21日) 膵島のソマトスタチン陽性細胞からのソマトスタチン分泌を促進している (McEvoy et al., '81)。以上のようなことから、副腎皮質ホルモンは胎生期の膵島あるいは膵島細胞の発達に促進的か抑制的か、いずれかの方向で影響を及ぼすものと考えられる。本研究はラットにおける膵島細胞の分化を明確にするとともに、それに対する母体副腎皮質ホルモンの役割を明らかにすることを目的とし、次のような実験を行った。

第一章においては、膵島細胞の分化を光学顕微鏡的および電子顕微鏡的に観察するとともに、特に最近の高感度免疫組織化学的方法によって検討した。

第二章においては、本研究の主目的として、膵島細胞の初期分化に対する母体の副腎皮質ホルモンの役割を検討するため、妊娠6日目に母体の副腎を除去した胎子の膵島細胞の分化を免疫組織化学的に観察した。

第三章においては、母体副腎皮質ホルモン欠如の下での胎子膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの局在について観察した。

本論文は以下の2つの論文をまとめたものである。論文1は第二章の一部、論文2は第一章の一部について報告したものである。

1. Effect of maternal adrenalectomy and corticosterone therapy on the early development of B-cells in the fetal pancreatic islet in the rat. (1996)

Komatsu, S., Yamamoto, M., Takizawa, T., Shirai, M., Arishima, K. and Eguchi, Y.

J. Vet. Med. Sci. 58:995-999.

2. Ontogeny of somatostatin cells in the rat fetal pancreas. (1997)

Komatsu, S., Yamamoto, M., Arishima, K. and Eguchi, Y.

J. Vet. Med. Sci. 59:1165-1166.

## 第一章 膵島細胞の分化に関する光学および電子顕微鏡的研究

胎生期における膵臓内分泌部の分化については、今まで数多くの報告がなされている。ラットにおいて、電子顕微鏡的観察によって膵臓内分泌部は胎齢11日にすでに同定され、グルカゴン顆粒が観察されている (Pictet et al., '72)。またこの胎齢において、生化学的にはインシュリンとグルカゴンが検出されており (Clark & Rutter, '72 ; Rall et al., '73)、ソマトスタチンは胎齢14日に生化学的に検出されている (McIntosh et al., '77)。このような電子顕微鏡的、生化学的な実験に加えて、免疫組織化学的にも膵臓内分泌部の分化については研究されている。これらの実験から、ラット膵臓内分泌部は胎齢11日という早い時期から分化を始め、胎生末期から新生期にかけて形態学および機能的に成熟していく。

本章においては、本研究の主目的である母体の副腎が胎子膵島細胞の分化に及ぼす影響を検討するための基礎的な知識を得るため、膵臓原基が出現した後の胎齢11~21日のラットを用い、膵臓の分化の過程について、特に膵島の分化を中心に光学顕微鏡および電子顕微鏡的に観察した。また3種の膵島ホルモン (インシュリン、グルカゴン、ソマトスタチン) に対する抗血清を用いて、各膵島ホルモン含有細胞の出現時期およびその発生パターンも併せて検討した。



## 第一節 材料および方法

### 1) 使用動物

本研究において用いた動物は、Wistarラット (CLEA) である。ラットは一定の明暗周期 (12時間明期、12時間暗期) および $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の条件下で飼育し、飼料 (Labo MR Breeder) と水を自由に与えた。

妊娠日数は、一晚雌雄を同居させ、翌朝膈垢中に精子の認められたものを妊娠0日目としてそれから起算した。また、胎子の胎齢は、母体の妊娠第1日目を胎齢第1日としてそれから起算した。

### 2) 組織学的観察方法

胎齢11~21日の胎子を実験において使用した。各胎齢とも剖検は午後1時に行った。

#### 光学顕微鏡的観察方法

母体放血死後、直ちに子宮から胎子を取り出した。胎齢12日および13日の胎子は、直ちにブアン液に浸した。胎齢14~18日の胎子は腸管とともに脾臓を取り出し、ブアン液で固定した。胎齢19~21日の胎子は、脾臓を取り出しブアン液で固定した。固定した臓器は常法に従いアルコール脱水し、パラプラスチック (Sherwood Medical) に包埋し、 $5\mu\text{m}$ の連続切片を作成した。切片はヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。

#### 免疫組織化学的観察方法

光学顕微鏡的観察方法と同様の材料をブアン固定、パラプラスチック包埋し、

5 $\mu$ mの連続切片を作成した。切片は抗インシュリン血清 (INCSTAR, Corp.)、抗グルカゴン血清 (INCSTAR, Corp.)、あるいは抗ソマトスタチン血清 (ZYMED LABORATORIES, INC.) を用いて酵素抗体ABC法を施し、光学顕微鏡下で観察した。使用した抗血清の希釈倍率は以下の通りである；抗インシュリン血清：500～1000倍、抗グルカゴン血清：2000倍、抗ソマトスタチン血清：500倍。

### 電子顕微鏡的観察方法

光学顕微鏡的観察と同様の材料を電子顕微鏡的に観察した。組織は2%グルタル・アルデハイド-2%パラホルムアルデハイド (0.1M カコジル酸緩衝液、pH 7.4に溶解) で2時間固定後、0.1M カコジル酸緩衝液、pH 7.4でよく洗浄し、1%四酸化オスミウムによる後固定を行った。その後、同じ緩衝液でよく洗浄し、常法に従いアルコール脱水を行った後に、エポン812 (TAAB LTD.) に包埋した。固定および脱水の操作は4℃の下で行った。超薄切片を作成する前に、まず0.5～1.0 $\mu$ mの厚切切片を作成し、メチレンブルー加温染色を施し、光学顕微鏡で観察場所を確認した。厚切切片により光顕的に良好と判断された部位の500～900オングストロームの超薄切片を作成した。超薄切片の作成は、JUM-7型ミクロトーム (日本電子) を用いて行った。超薄切片は、酢酸ウラニルとクエン酸鉛によって二重染色を施し、電子顕微鏡 (JEM-1210、日本電子) により観察した。

## 第二節 観察結果

胎齢11日の胎子縦断像を図-1~2に示した。

この胎齢において、膵臓原基はまだ前腸（G）より膨出していなかった（図-1）。グルカゴン陽性細胞（矢印）が前腸（G）の背側部に初めて検出された（図-2）。インシュリンおよびソマトスタチン陽性細胞はまだ存在していなかった。

胎齢12日の膵臓原基の組織像を図-3~6に示した。

膵臓原基（※）は、1~2層の上皮からなる前腸から出芽し、3~4層の多列状の細胞によって管状構造を形成していた（図-3a）。管状構造を形成している細胞は細長い核を持ち、また細胞質に乏しいが、これらの細胞の中で、細胞質が明るく少し大きめの細胞が内分泌細胞（図-3b、矢印）である。内分泌細胞は3~4個で集団をなし、膵島原基と思われる。

この胎齢において、グルカゴン陽性細胞は数が増加し、膵臓原基内で単独、あるいは小集団を形成して存在していた（図-4）。インシュリン陽性細胞が、この胎齢において初めて膵臓原基内に観察された（図-5）。ソマトスタチン陽性細胞はインシュリン陽性細胞と同様、胎齢12日において初めて膵臓原基内に認められた（図-6）。この胎齢では膵臓原基内ではグルカゴン陽性細胞がもっとも優勢であり、次いでインシュリン陽性細胞が多く存在していた。ソマトスタチン陽性細胞はもっともその出現頻度が低く、まれに観察されるにすぎなかった。インシュリン陽性細胞、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞は、これ以降すべての胎齢に存在した。

胎齢13日の膵臓原基の組織像を図-7~11に示した。

この胎齢において、膵島原基（※）は胎齢12日に比べ原基を構成している細胞数が増え、原基自身の大きさも増大した。内分泌細胞は周囲の外分泌細胞に比べ細胞が大きく、また細胞質も拡大していた（図-7、矢印）。細胞が規則正しく配列して、腺房終末部様の構造が観察された（図-7、矢頭）。

グルカゴン陽性細胞（図-8）およびインシュリン陽性細胞（図-9）の数は増加していた。両細胞とも主に膵島原基内に存在していたが、その配置は不規則であった。ソマトスタチン陽性細胞の数はほとんど変わらず、わずかに観察されるのみであった（図-10）。

電子顕微鏡的に観察すると、内分泌細胞は顆粒の芯の電子密度が低いものから高いもの、また限界膜と芯との間の暈（ハロー）は狭いものから広いものまで様々な顆粒を持っていたが、内分泌細胞の顆粒の特定はできなかった（図-11）。一つの細胞が持つ顆粒の数は少なく、粗面小胞体およびゴルジ装置はあまり発達していなかった。ミトコンドリア（M）は多数存在し、細長い杆状形であった。ポリゾームが豊富な細胞も見られた。

胎齢14日の膵臓原基の組織像を図-12~16に示した。

膵臓原基はさらに発達が進行して間葉組織内に広い範囲で存在するようになった（図-12）。管腔はまだあまり発達していないが外分泌部の分泌管が観察されるようになった（図-12、矢頭）。膵島原基（※）は胎齢13日と同様、明るい細胞集団をなしている。また膵島原基が分泌管の壁が肥厚して形成されている像が多く見られるようになった。膵島原基内に毛細血管が初めて見られるようになったが、その数は少なかった。

膵島原基内の大部分の膵島細胞は抗グルカゴン血清に対して陽性反応を示し

た（図-13）。胎齢13日に比べてインシュリン陽性細胞の数は増加していたが、膵島原基内における割合はグルカゴン陽性細胞に比べて低かった（図-14）。ソマトスタチン陽性細胞数はわずかに増加していた。

顆粒は電顕的にハローの広い顆粒（図-15、矢印）を持つインシュリン産生細胞やハローの狭い顆粒（図-16、矢印）を持つグルカゴン産生細胞が観察されるようになった。顆粒の量は胎齢13日と同様少なかった。胎齢13日に比べてゴルジ装置（G）や小胞体（ER）が発達していた。

胎齢15日の膵臓原基の組織像を図-17～21に示した。

膵島原基（※）は胎齢14日と比べて間葉中にさらに明瞭となった（図-17）。外分泌部はよく発達し、分泌管および腺房終末部の数は増加していた。

グルカゴン、インシュリンおよびソマトスタチン含有細胞の分布は、胎齢14日とほぼ同様であった（図-18、19、20）。

胎齢16日の膵臓原基の組織像を図-21～24に示した。

既存の膵島原基（※）はそれ自身はほとんど成長していないが（図-21）、分泌管から出芽中の膵島原基が多数観察された（図-22、矢印）。外分泌部の発達が著しく、分泌管は管腔が明瞭になり、その数は激増していた。しかし、終末部はいまだ細胞質に乏しく、チモーゲン顆粒は観察されなかった。

胎齢15日まではグルカゴン陽性細胞およびインシュリン陽性細胞は、両細胞とも主に膵島原基内に観察されたが、この胎齢においてインシュリン陽性細胞の分布に変化が見られた。グルカゴン陽性細胞の数は増加したが、主に膵島原基に存在し、わずかに分泌管の壁に存在するものも観察された（図-23）。インシュリン陽性細胞は胎齢15日から激増し、膵島原基内（図-24）ばかり

でなく分泌管にも多く存在していた。グルカゴン陽性細胞とインシュリン陽性細胞の細胞数の割合を比較すると、この胎齢ではまだグルカゴン陽性細胞の方がわずかに優勢であった。

胎齢18日の膵臓の組織像を図-25～28に示した。

既存の膵島原基は大きく発達し、膵島内部に分布している毛細血管が発達していた（図-25、矢印）。また分泌管から新たに出芽している小さな膵島原基が多数観察された。

外分泌部では、終末部が著しく発達していた。胎齢17日においては、チモーゲン顆粒を有している腺房細胞はわずかに存在するだけであったが、胎齢18日になるとほとんど全ての腺房細胞がチモーゲン顆粒を持っていた。

胎齢18日において、膵島ホルモン含有細胞の割合に大きな変化が見られた。すなわち、成熟ラットにおいて観察されるものと同様、インシュリン陽性細胞が最も数の多いホルモン含有細胞となり、膵島内の分布も胎齢16日とは違って膵島の中心部分を占めるようになった（図-26）。グルカゴン陽性細胞（図-27）およびソマトスタチン陽性細胞（図-28）は、膵島の周辺部に分布していた。

胎齢21日の膵臓の組織像を図-29～31に示した。

膵島は胎齢18日からさらに大きく発達した（図-29）。膵島ホルモン含有細胞の配置は胎齢18日と同様、インシュリン陽性細胞が膵島の中心を占め、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞は、膵島の周辺部分に位置していた。

電顕によって典型的なインシュリン顆粒（図-30）とグルカゴン顆粒（図

ー31) が観察された。インシュリン顆粒の芯は電子密度が中程度であり、ハローは広い (図ー30、矢印)。グルカゴン顆粒はインシュリン顆粒よりも電子密度が高い芯を持ち、ハローは狭かった (図ー31、矢印)。

### 第三節 考察

胎齡11日から21日のラット胎子の膵臓を観察した結果、以下のことが明らかとなった。

胎齡11日において、膵臓原基はまだ前腸より出芽していなかったが、胎齡12日には管状の膵臓原基が認められた。つまりラット胎子膵臓は、胎齡11日から12日の間に前腸から膨出するようである。免疫染色法を用いるとA細胞は膵臓原基が光学顕微鏡的にまだ観察されない胎齡11日にすでに存在しており、前腸の背側部の、背側膵が膨出すると思われる部位にグルカゴン陽性細胞が確認された。本章の観察において、B細胞およびD細胞はA細胞よりも1日遅く、胎齡12日に初めて出現した。免疫染色による各膵島ホルモン含有細胞の出現時期については様々な報告があるが、A細胞、B細胞およびD細胞は各々胎齡11日、12日および15日に出現すると言われている (Yoshinari & Daikoku, '82)。本章の実験の結果、A細胞およびB細胞の出現時期はこれまでの報告と一致した。しかし本章の実験ではソマトスタチン細胞は胎齡12日の膵臓において初めて検出された。本章で用いた抗体、染色方法および観察方法はYoshinari & Daikoku ('82) が行ったものとは異なる。使用した抗体の力価の違いは比較できないが、本章では図には示していないが抗ソマトスタチン血清の免疫吸収試験を行い、抗血清の特異性を確認した後に染色に用いた。染色方法については、Yoshinari & Daikoku ('82) は Peroxidase-antiperoxidase法 (PAP法) を行っているが、本章では PAP法よりも感度が高いAvidin-biotinylated peroxidase complex法で染色した。また本章では胎子の連続切片を作成し、すべての切片を免疫染色し注意深く観察した。胎齡12~15日の間、ソマトスタチン陽性



細胞はわずかしかな存在していなかったため、感度の低い染色方法を使用して、連続切片を用いて観察していないYoshinari & Daikoku ('82)はソマトスタチン陽性細胞を見落とししたと思われる。

A細胞は胎齢11日から12日の間に激増していた。藤島原基が光学顕微鏡的に明らかに認識できるようになる胎齢13日以降しばらくは、藤島細胞の大部分は抗グルカゴン血清に陽性であった。B細胞は藤島の一部にのみ存在し、藤島内の配置に局在性はなかった。D細胞は胎齢12日に初めて出現して以来、あまり数は増えなかった。実際に細胞数をカウントしていないので確かではないが、胎齢12～15日の間、A細胞およびD細胞の数は増加していたが、その増加は緩やかなものに思われた。

胎齢13日の膵臓を電子顕微鏡的に観察すると、藤島原基の細胞に顆粒が存在するものがあったが、顆粒は各膵島細胞を同定することができるような特徴を示していなかった。胎齢14日になると、顆粒の特徴からハローの大きいインシュリン顆粒とハローの小さいグルカゴン顆粒（小川ら、'87）が確認されたが、顆粒の特徴によって分類できる内分泌細胞の数はまだ少なかった。ラット胎生期の膵島細胞の発達を電子顕微鏡を用いて観察した報告はあまり多くないが、初期の発生に注目した論文によるとA細胞は胎齢11日に分泌顆粒を持っている像が観察されるのに対し、B細胞は胎齢15日に初めて顆粒を持った像が見られるという（Pictet et al., '72）。本章においては、電子顕微鏡を用いての観察は胎齢13日以降の膵臓しか行っていないが、胎齢14日の膵島細胞が持つ顆粒は明らかにA細胞およびB細胞特有の特徴を示しており、前述の報告とは結果は異なるものとなった。電子顕微鏡の性能および電顕切片作成の技術の向上を考え合わせれば、本章の結果は確かなものと考えられる。しかし、さらに膵島細胞を厳密に分類するならば、免疫電顕あるいは隣接厚切切片

を免疫染色する方法などを用いて証明する必要があると思われる。

胎齢16日以降、各膵島細胞の分布に変化が見られた。この時期までは初期に発生した膵島原基が生育しているだけであったが、これに加えて、外分泌部の分泌管から新たに内分泌細胞が出芽し、膵島原基を形成し始めた。免疫染色の結果から、新たに発生した内分泌細胞のほとんどはB細胞であった。本章においては実数は測定していないが、胎齢16日以降はB細胞の数が飛躍的に増加していたが、A細胞およびD細胞はそれほど増加していないように思われる。また膵島内のホルモン含有細胞の分布および配置は、胎齢16日までA細胞が最も多かったが、胎齢15日以降のB細胞の増加の結果、胎齢18日にはB細胞が最も多くなり、成体の膵島に見られるものと同様、B細胞が膵島の中心を占め、A細胞、D細胞が膵島の周辺に位置するようになった。そして胎齢20日になると一部の膵島は成体の膵島と同様の形態を示すようになっていた。

以上のことから、膵島の発生はいくつかのステップに分けることができるように思われる。第一のステップは胎齢12～15日である。胎齢12～15日までは膵島原基を形成している膵島細胞の増殖が緩やかであるため、膵島原基の発達は緩やかになり、胎齢12～14日の間に膵島原基は大きくはなるが、数はあまり増加しないのであろう。胎齢15日までの膵島原基は、Glucagon rich isletとも言えるような、A細胞の集団である。しかし胎齢14～16日の間、外分泌部の分泌管が急増し、その増加した分泌管上皮細胞から、新たに内分泌細胞が出芽し始めていた。この内分泌細胞は主にB細胞であった。したがって第二のステップとして、胎齢15日以降増加したB細胞の新生、あるいは新生されたB細胞の増殖が新たな膵島原基を形成していくことになる。既存の膵島原基内に存在したB細胞も増殖を繰り返し、それまで膵島原基の大部分を占めていたA細胞を周囲に押しやりながらB細胞が膵島の中心部分を占めるようになる

るのであろう。そして胎生末期には一部の脾島は成熟するのであろう。つまり胎齢16日以降の脾島の発育は、B細胞の新生、および/あるいは増殖に依存して、脾島の大きさおよび数を増していくものと考えられる。その後、胎生末期から生後にかけて、すべての脾島が形態学的および機能的に成熟していくのであろう。

#### 第四節 小括

ラット胎子膵島細胞の分化を光学顕微鏡的、免疫組織化学的および電子顕微鏡的に観察した。ラット胎子において膵臓原基は胎齢11日から12日の間に前腸から膨出して形成される。胎齢12日では膵島原基と思われる構造が確認され、胎齢13日になると膵島原基が膵臓外分泌部と明らかに区別された。膵島原基の数は胎齢15日まではあまり増えなかったが、胎齢16日以降、外分泌部の分泌管上皮から多数の新しい膵島原基が出芽し始め、膵島原基の数は劇的に増加し、大きさも増した。胎齢20日になると一部の膵島は成体の膵島と同様の形態を示すようになった。

免疫組織化学的に胎子膵臓を観察すると、A細胞が最も早く、胎齢11日に検出された。そして胎齢12日になるとB細胞およびD細胞が出現した。胎齢13～16日の間、膵島細胞の大部分はA細胞であった。胎齢14日以降、外分泌部の分泌管の数は増え、それに伴い分泌管上皮細胞からB細胞が新生され、B細胞の数は激増した。胎齢18日になると膵島細胞のうち、B細胞が最も多くなり、膵島内の局在性はB細胞が膵島の中心を占めるようになった。そしてA細胞およびD細胞が膵島の周辺に位置していた。

電子顕微鏡的観察により胎齢13日では各膵島細胞の同定は困難であったが、胎齢14日になると、同定できる膵島細胞の数は少ないが、B細胞とA細胞の同定ができた。胎齢が進むにつれ、各膵島細胞は顆粒の数が増え、胎齢21日になると、成体の膵島で見られるような特徴的な形態を示すようになった。

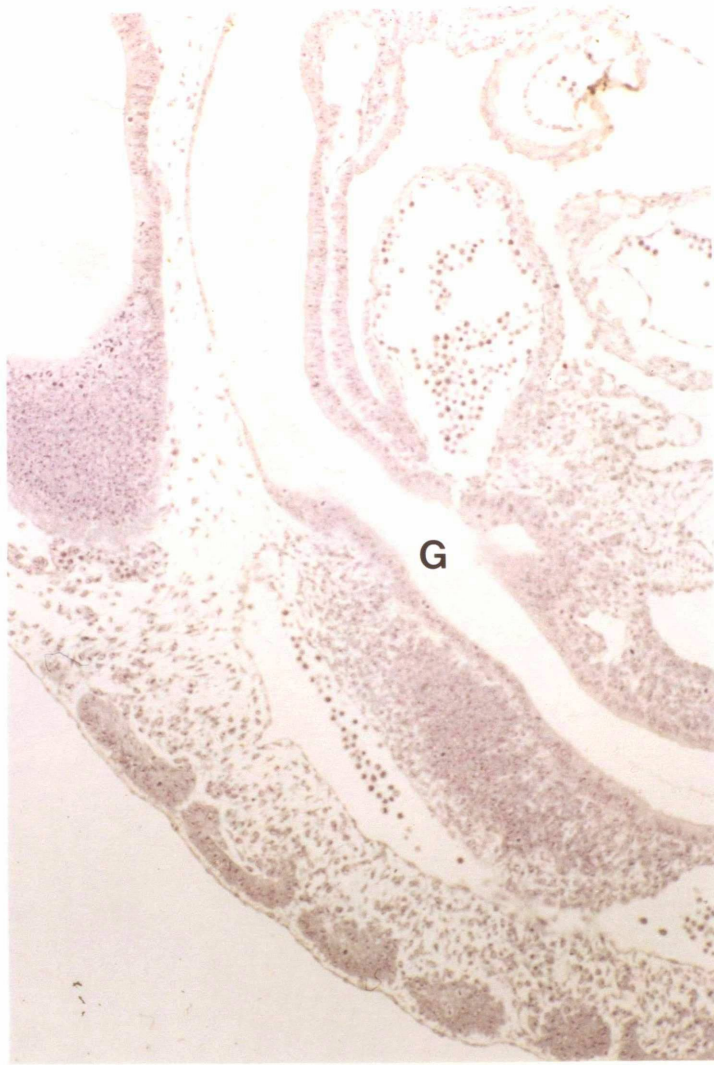


Fig. 1. 胎齡11日の胎子縦断面、H-E染色、x114  
G：前腸

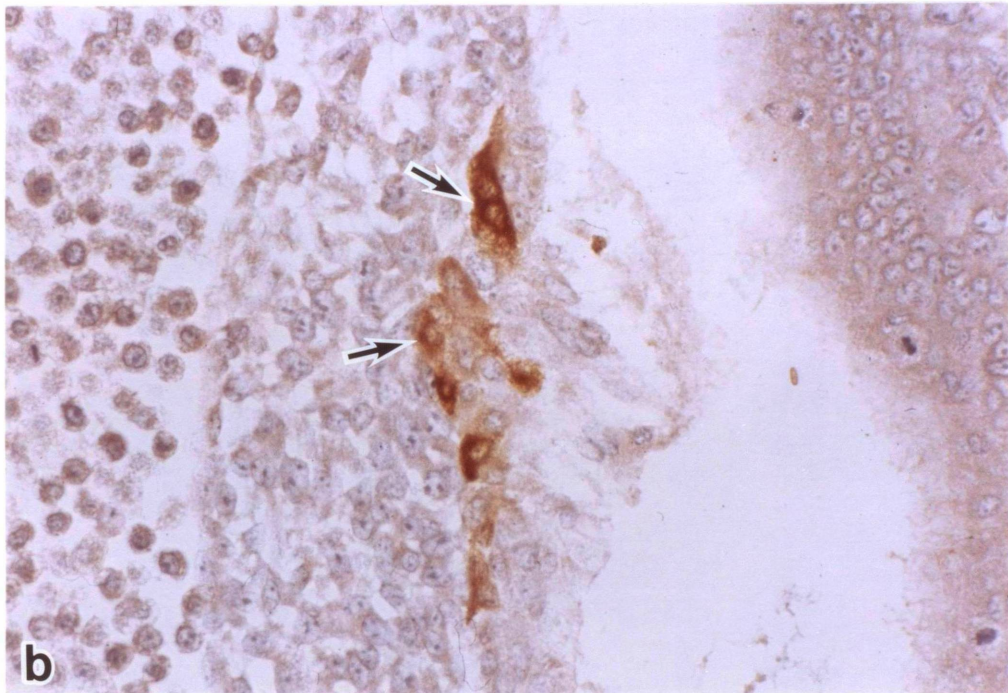
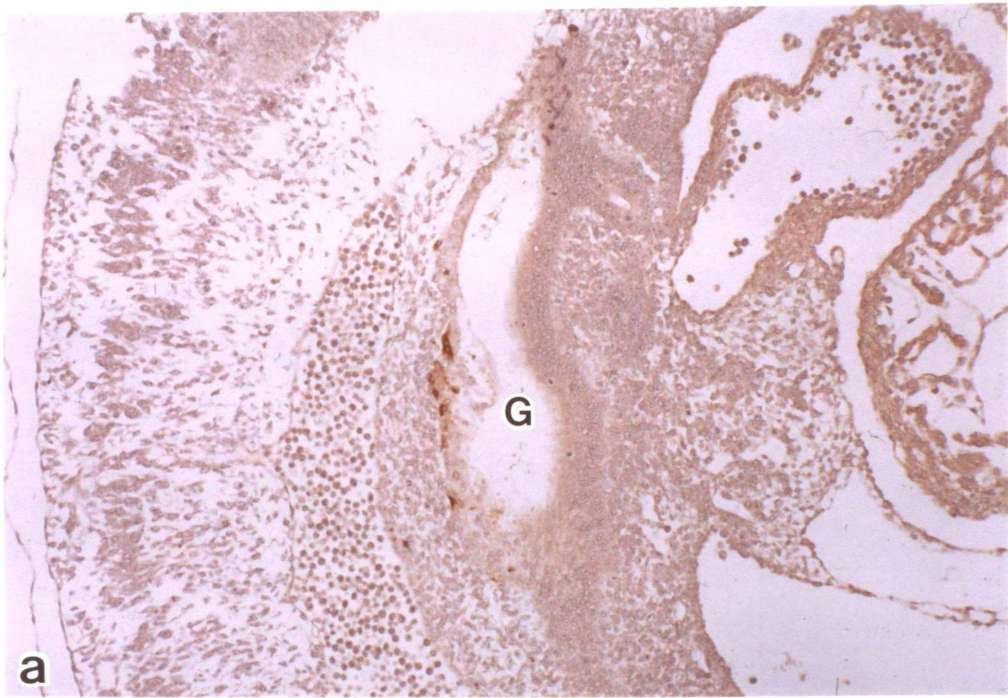


Fig. 2a, b. 胎齡11日の胎子縦断面、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色  
a: 全体像、x114  
b: aの拡大像、x470  
矢印: グルカゴン陽性細胞  
G: 前腸

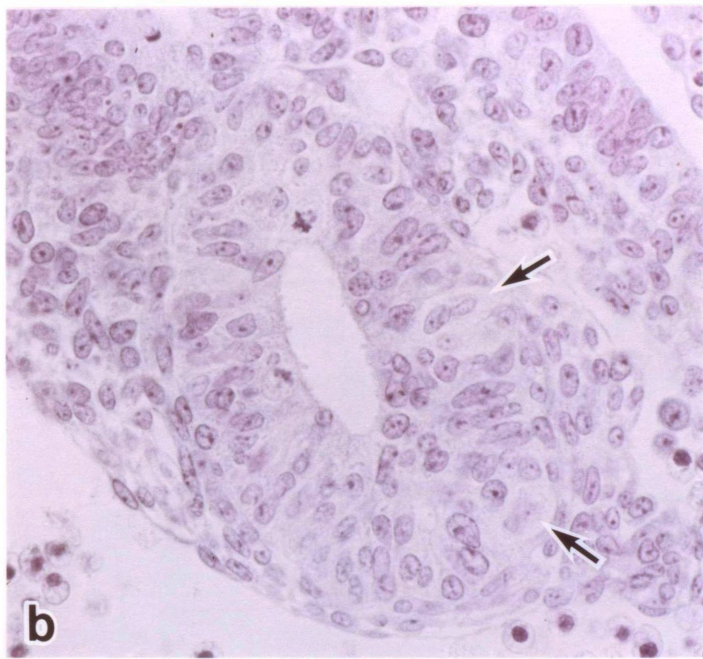
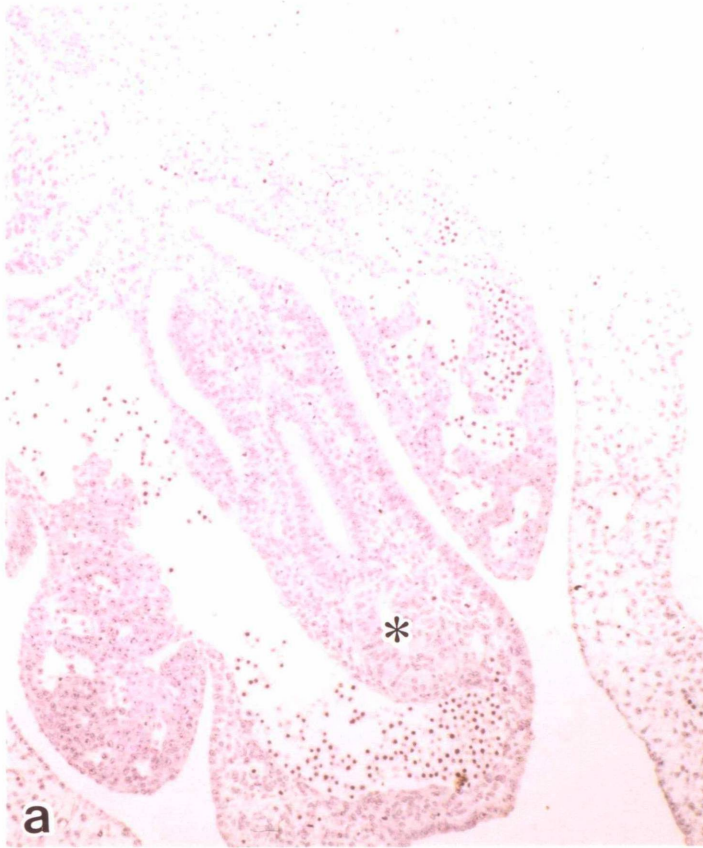


Fig. 3a, b. 胎齡12日の膵臓原基、H-E染色  
 a: 全体像、x114  
 b: aの拡大像、x470  
 ※: 膵臓原基  
 矢印: 内分泌細胞

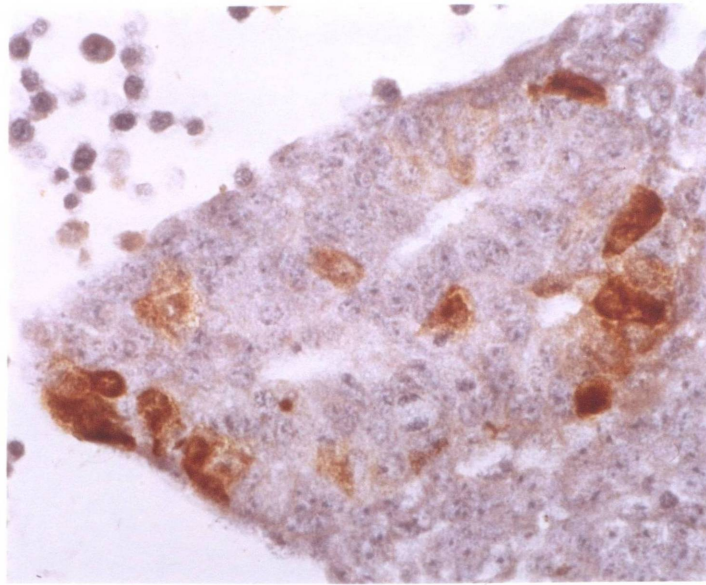


Fig. 4. 胎齡12日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

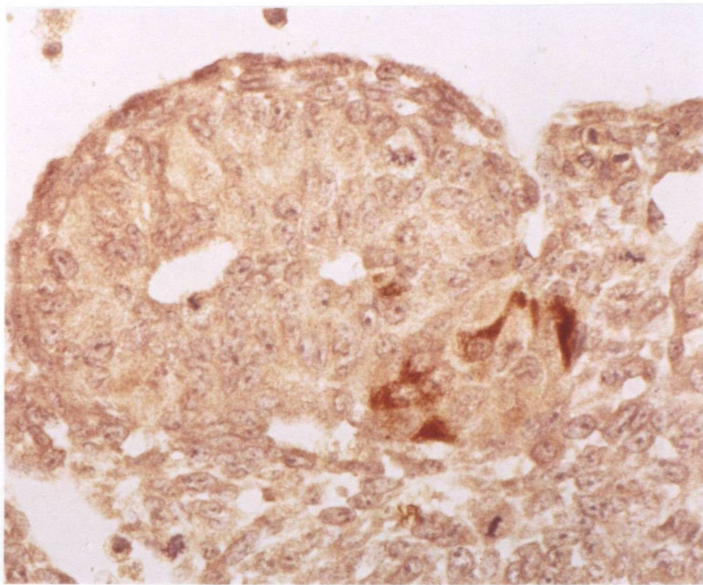


Fig. 5. 胎齡12日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

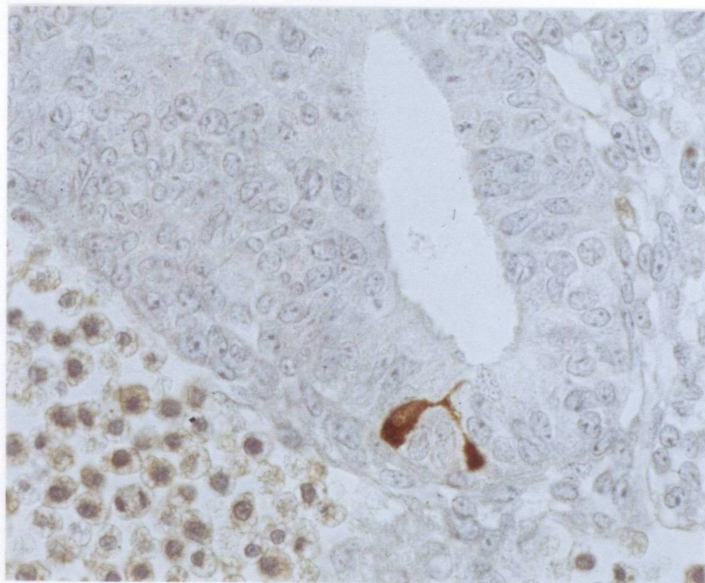


Fig. 6. 胎齡12日の膵臓原基、抗ソマトスタチン血清を用いた免疫染色、x470



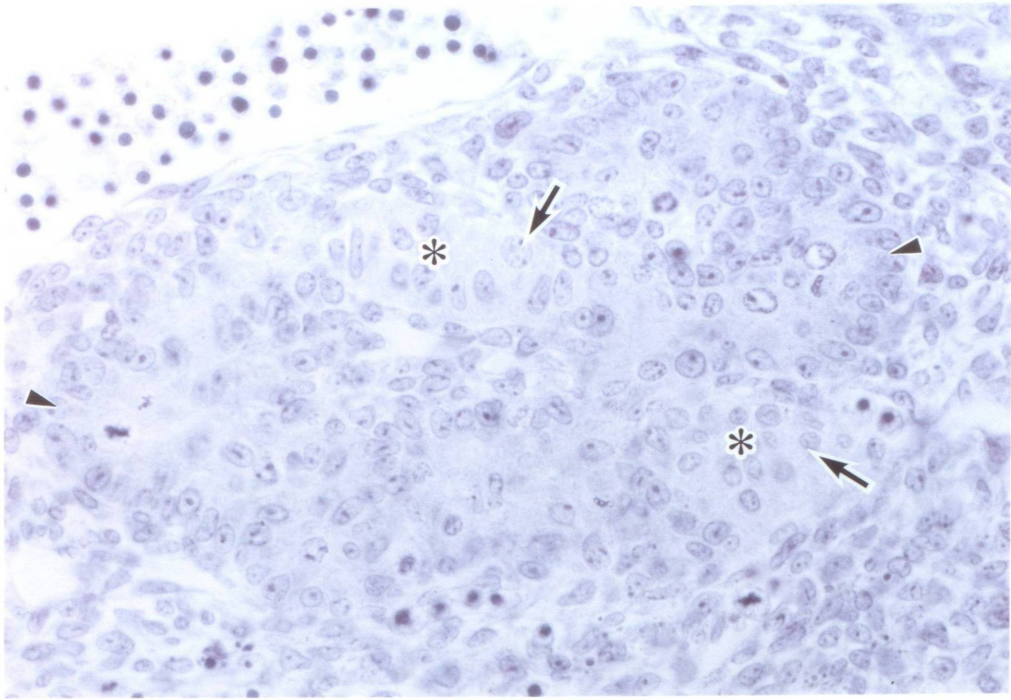


Fig. 7. 胎齡13日の膵臓原基、H-E染色、x470

※：膵島原基

矢印：内分泌細胞

矢頭：腺房様構造

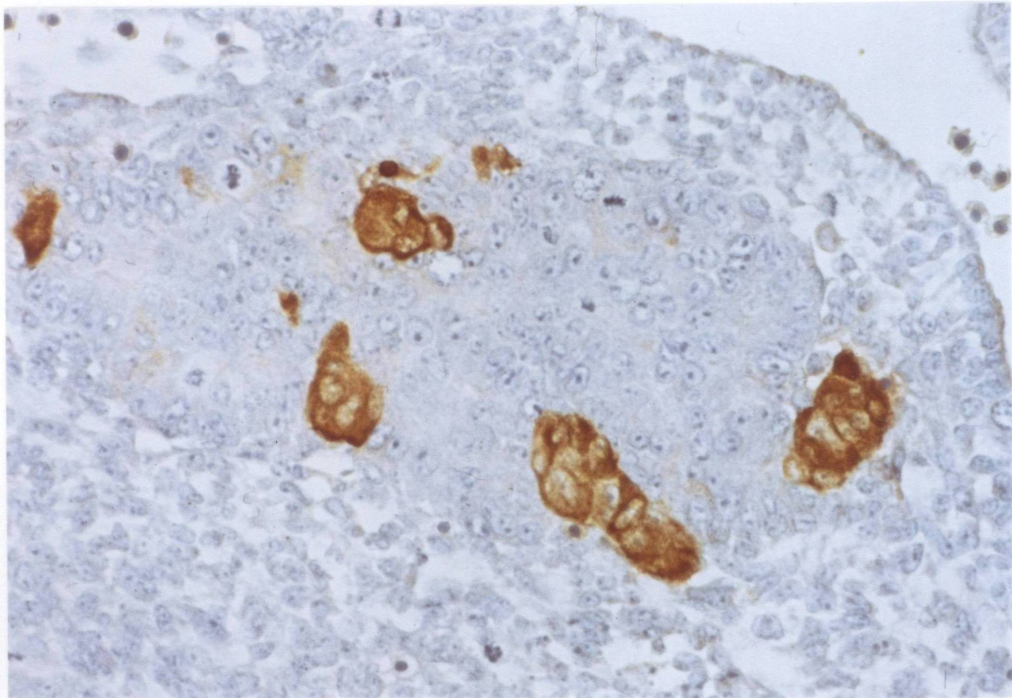


Fig. 8. 胎齡13日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

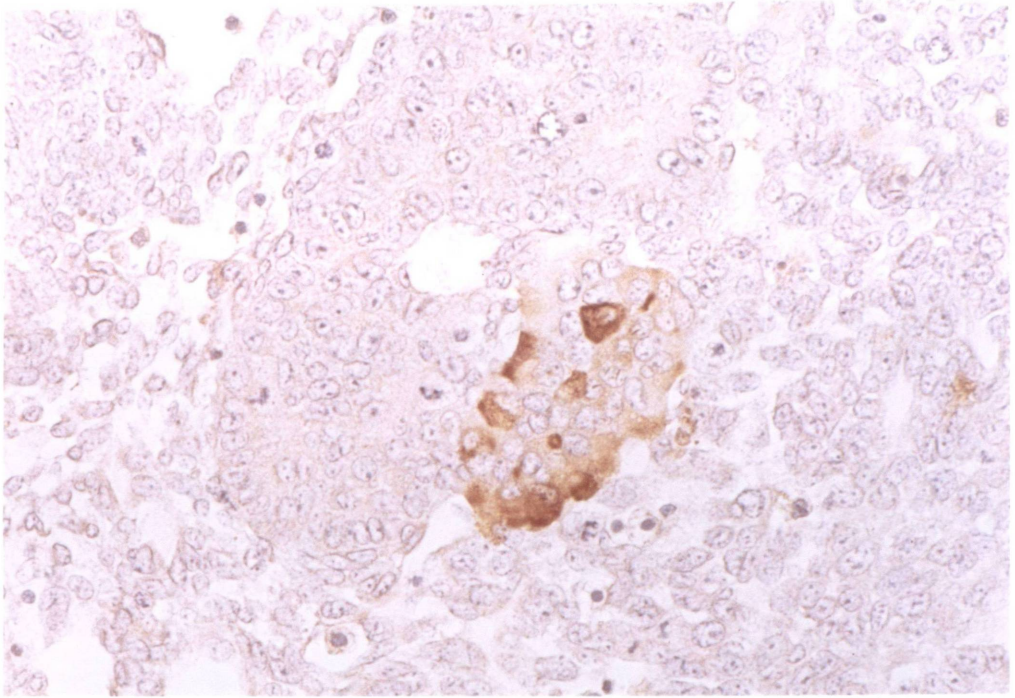


Fig. 9. 胎齡13日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

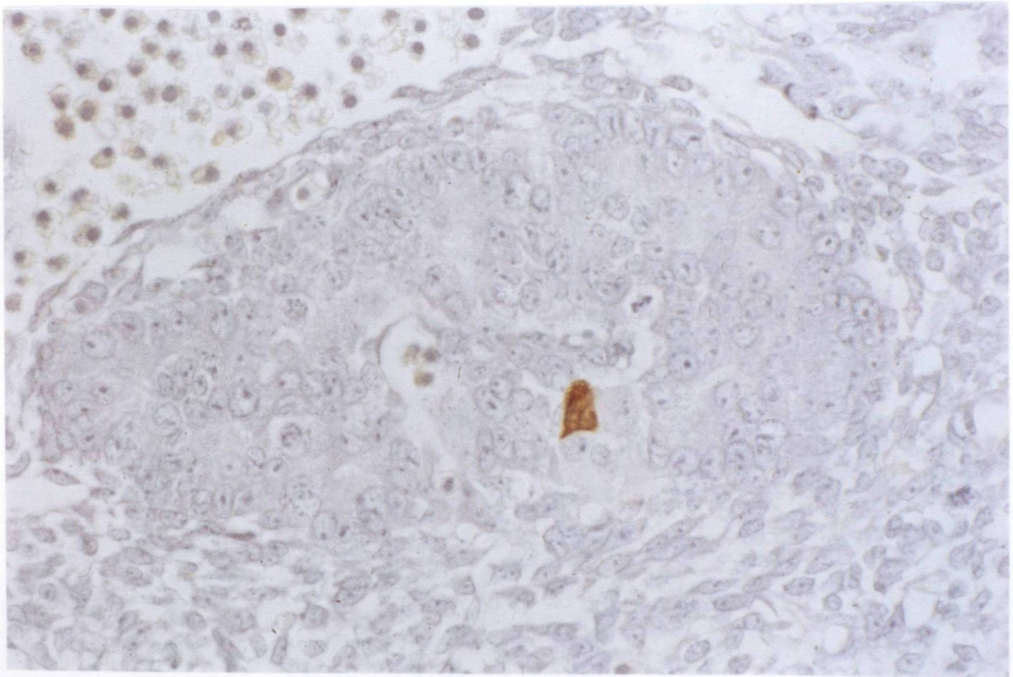


Fig. 10. 胎齡13日の膵臓原基、抗ソマトスタチン血清を用いた免疫染色、x470

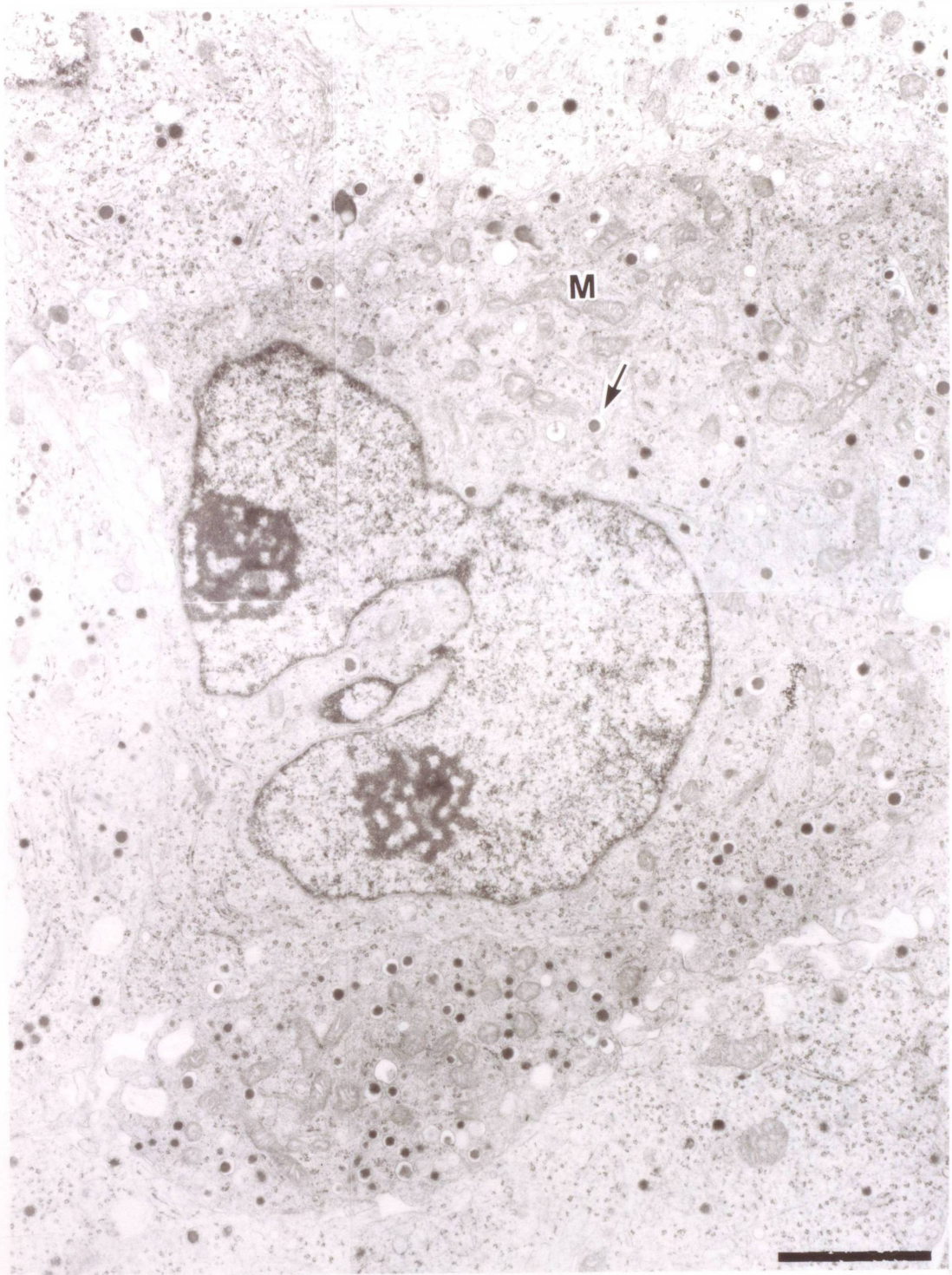


Fig. 11. 胎齡13日の膵島細胞、x110000

矢印：内分泌顆粒

M：ミトコンドリア

右下のバー：200nm

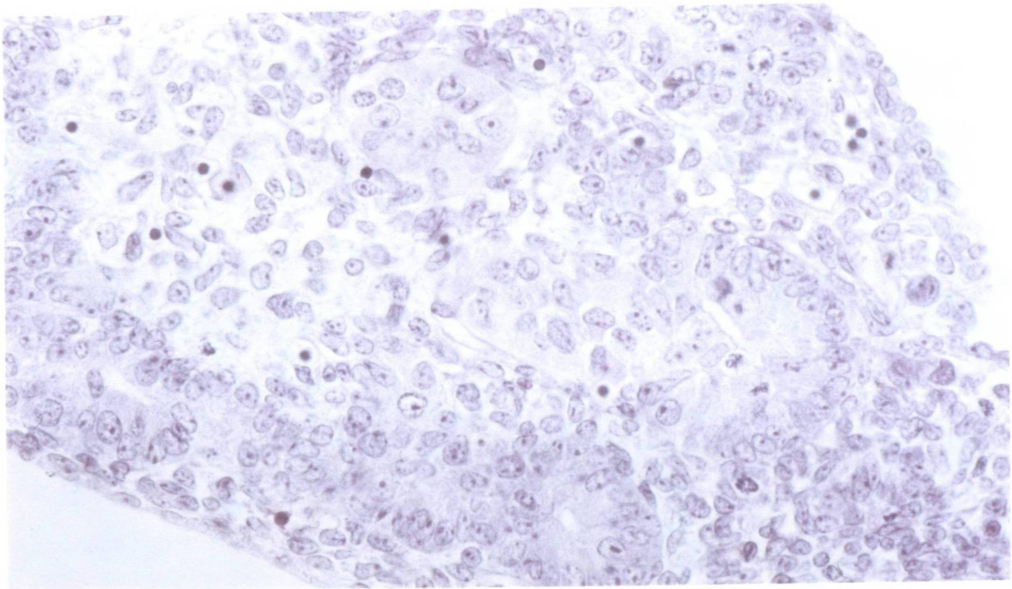


Fig. 12. 胎齡14日の膵臓原基、H-E染色、x470  
※：膵島原基 矢頭：分泌管

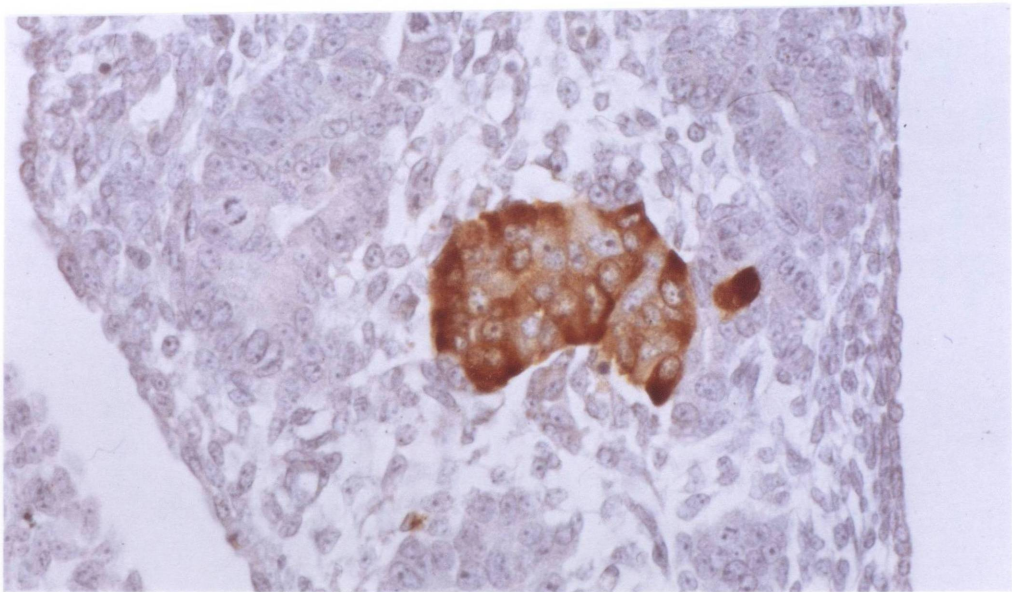


Fig. 13. 胎齡14日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

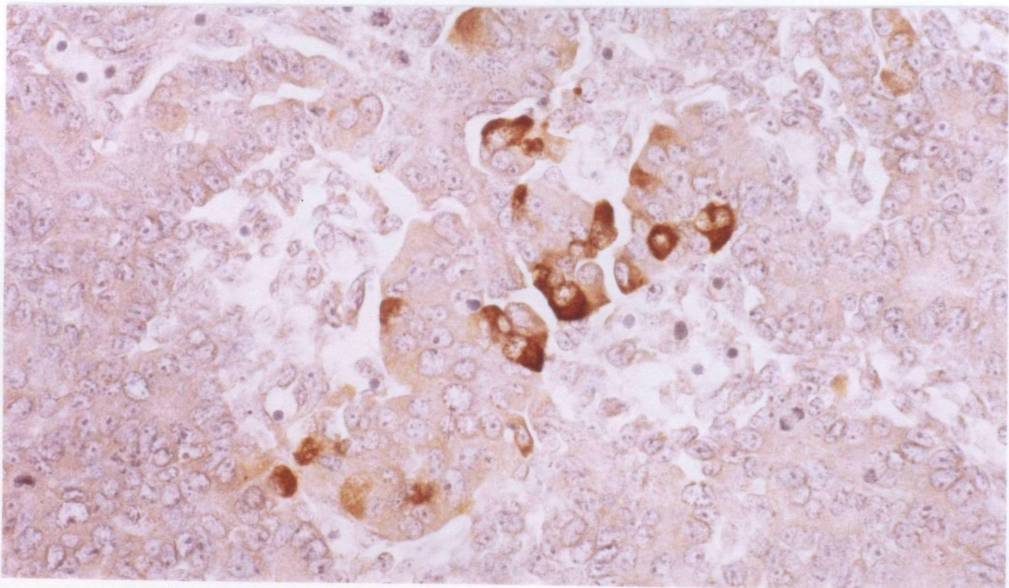


Fig. 14. 胎齡14日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

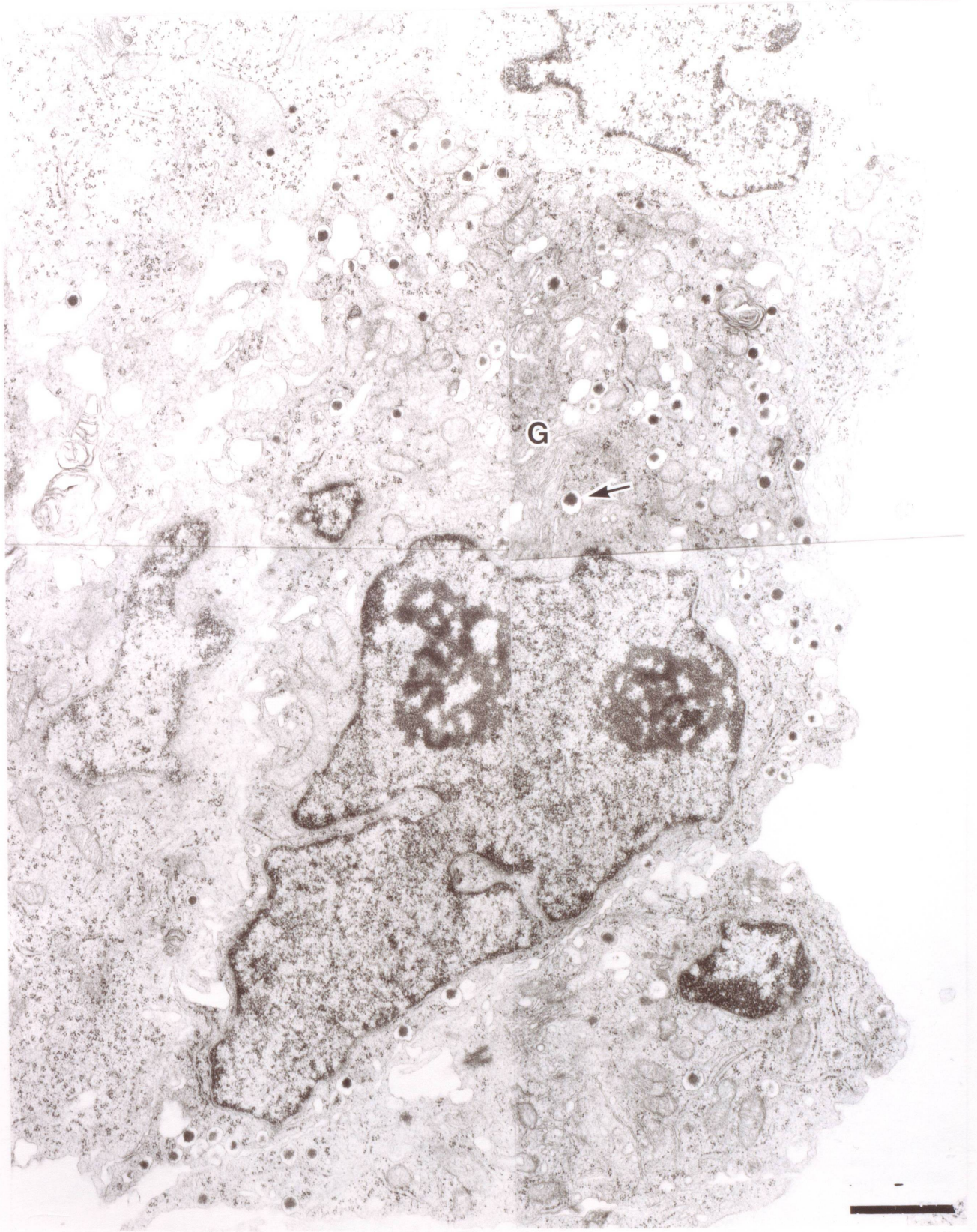


Fig. 15. 胎齡14日のインシュリン産生細胞、x18000  
矢印：インシュリン顆粒  
G：ゴルジ装置  
右下のバー：1 $\mu$ m

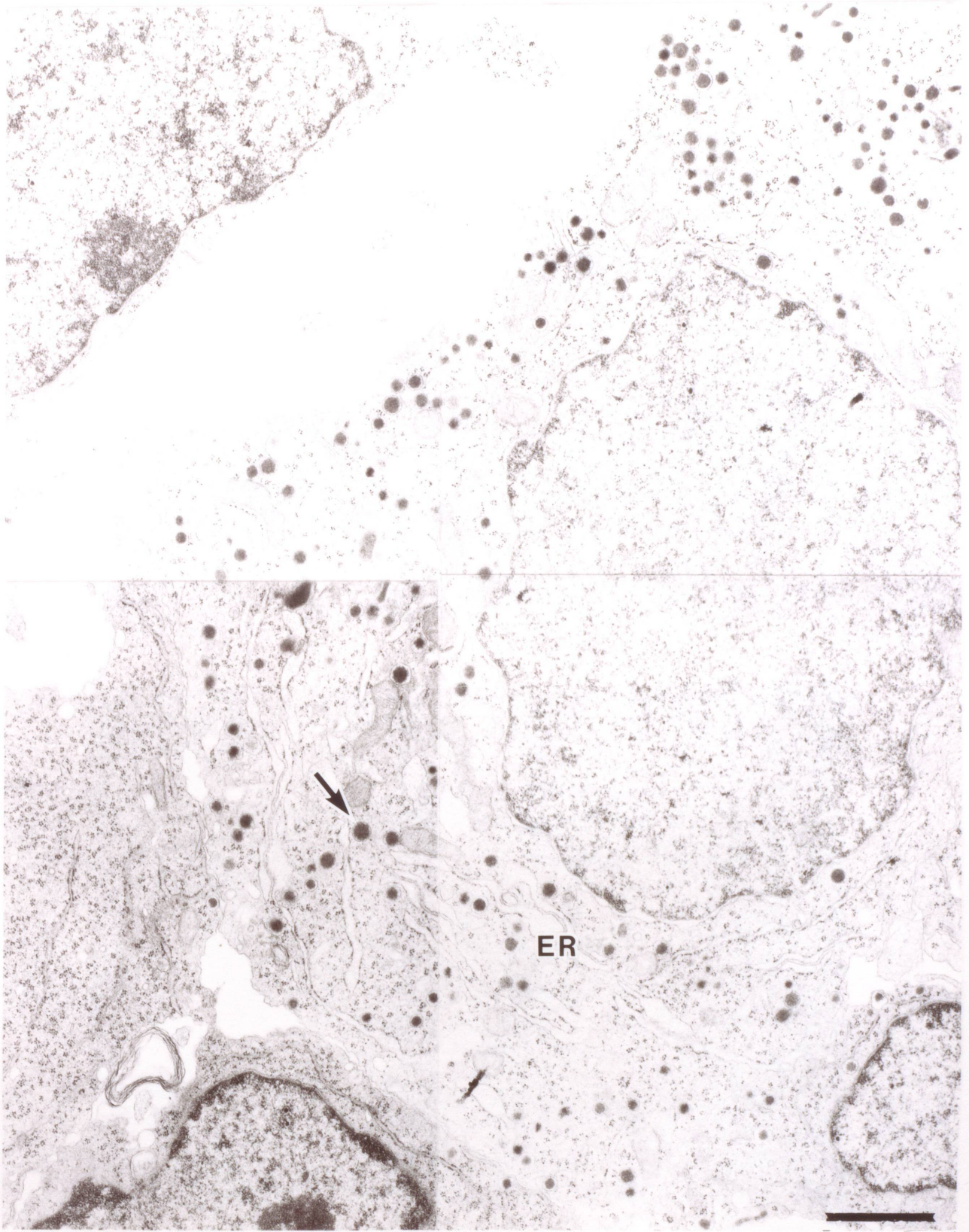


Fig. 16. 胎齡14日のグルカゴン産生細胞、x18000  
矢印：グルカゴン顆粒  
ER：小胞体  
右下のバー：1 $\mu$ m

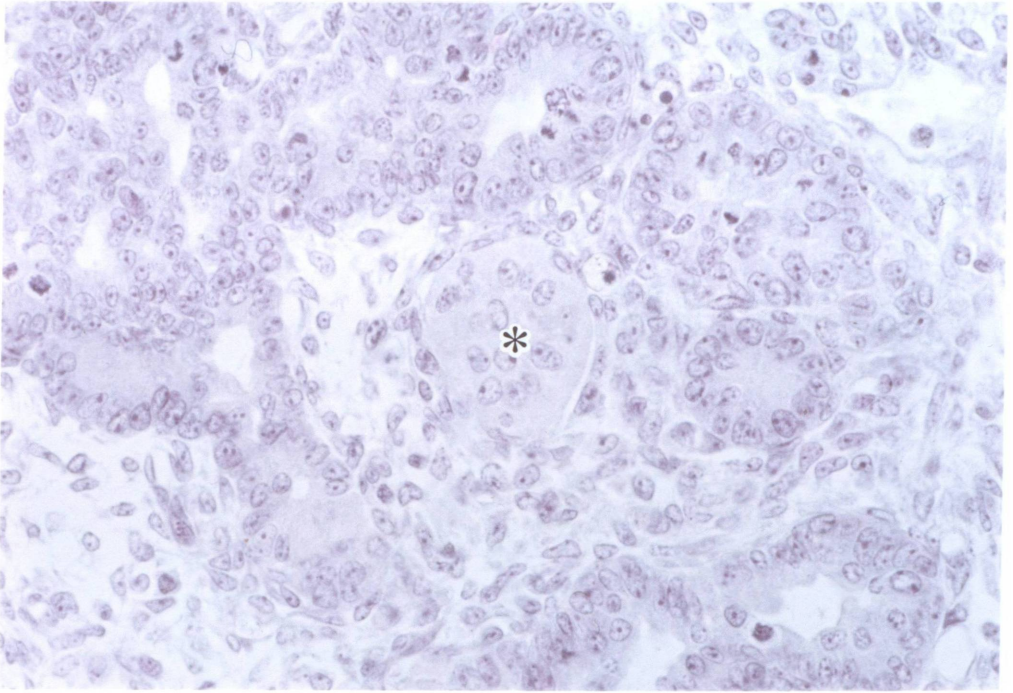


Fig. 17 胎齡15日の膵臓原基、H-E染色、x470  
※：膵島原基

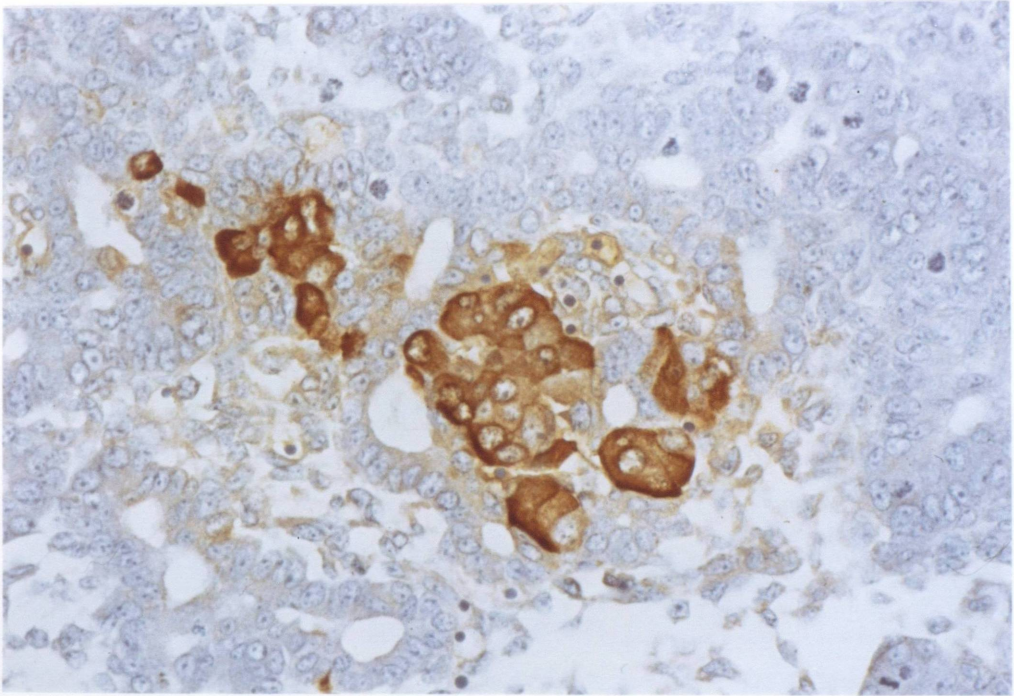


Fig. 18. 胎齡15日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

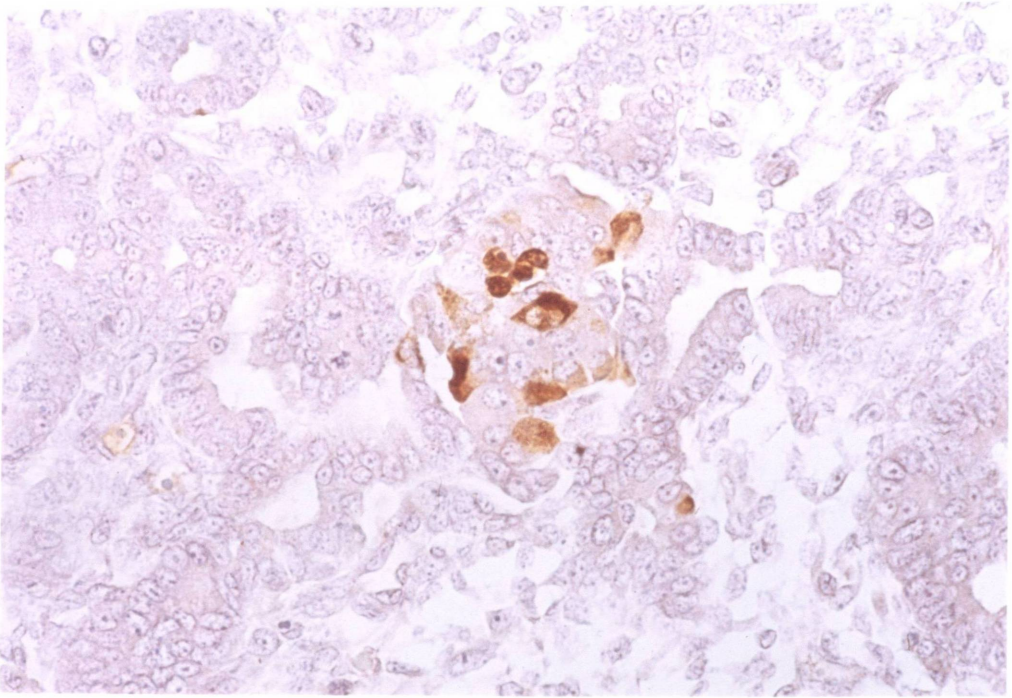


Fig. 19. 胎齡15日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

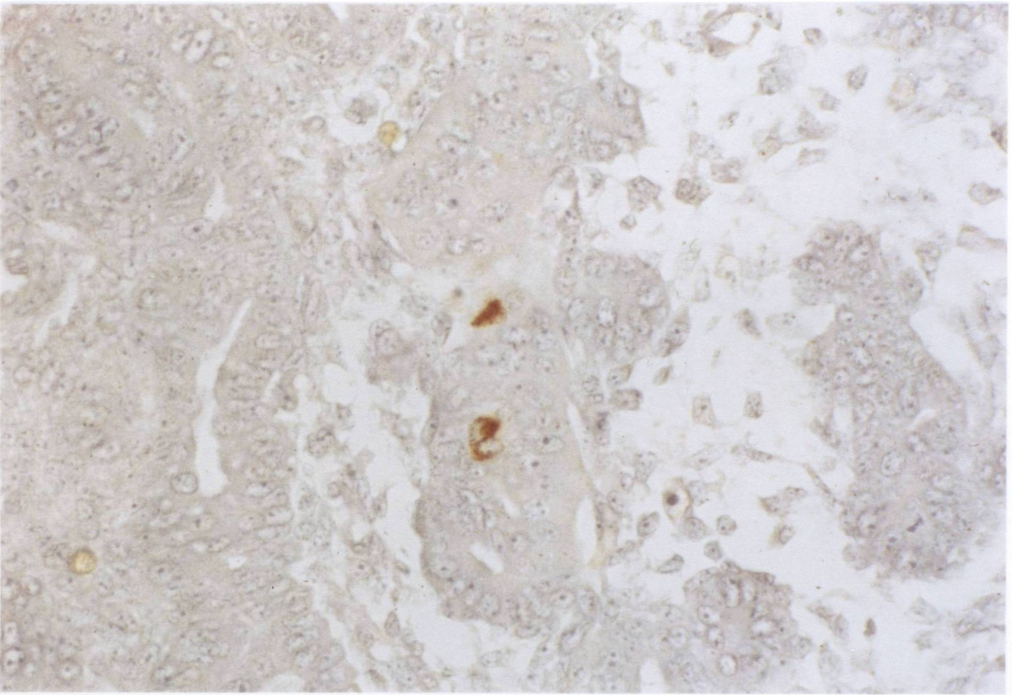


Fig. 20. 胎齡15日の膵臓原基、抗ソマトスタチン血清を用いた免疫染色、x470



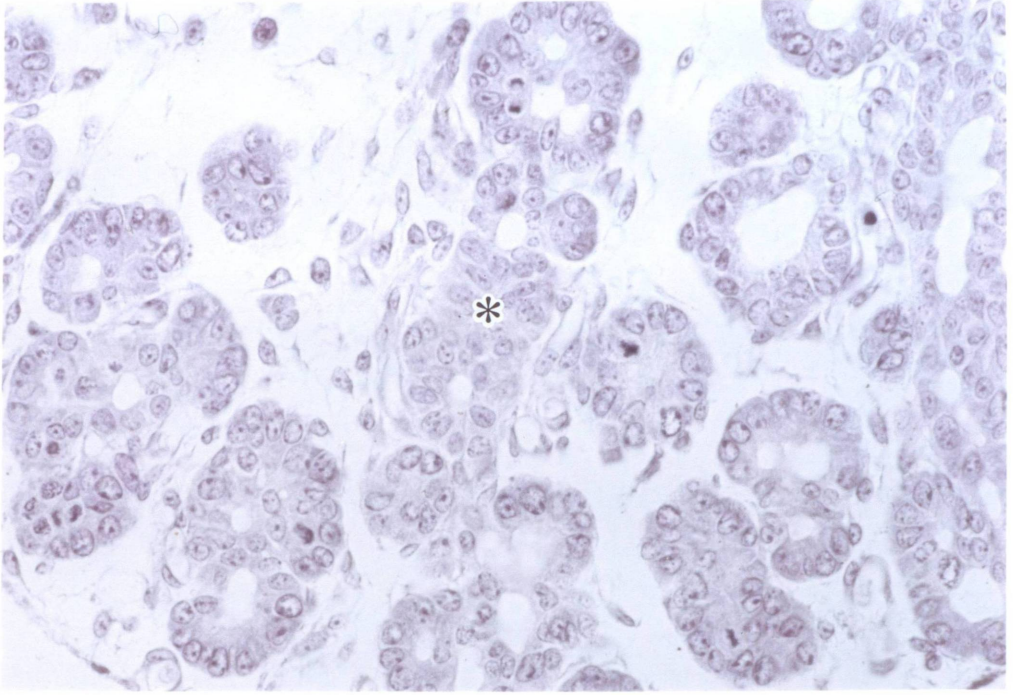


Fig. 21. 胎齡16日の膵臓原基、H-E染色、x470  
※：膵島原基

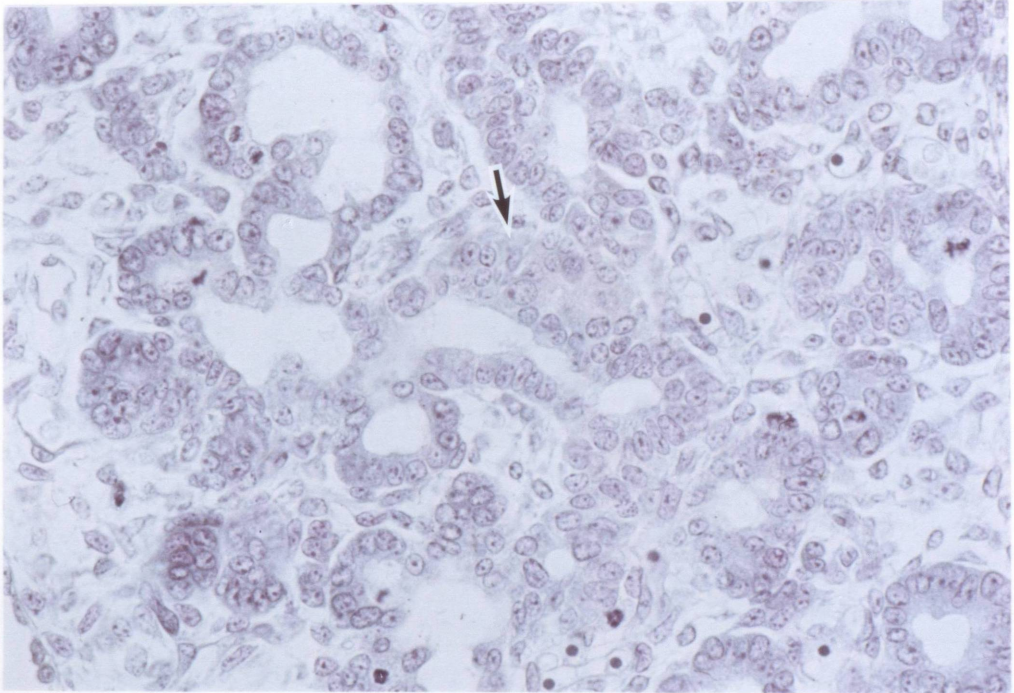


Fig. 22. 胎齡16日の膵臓原基、H-E染色、x470  
矢印：出芽中の膵島原基

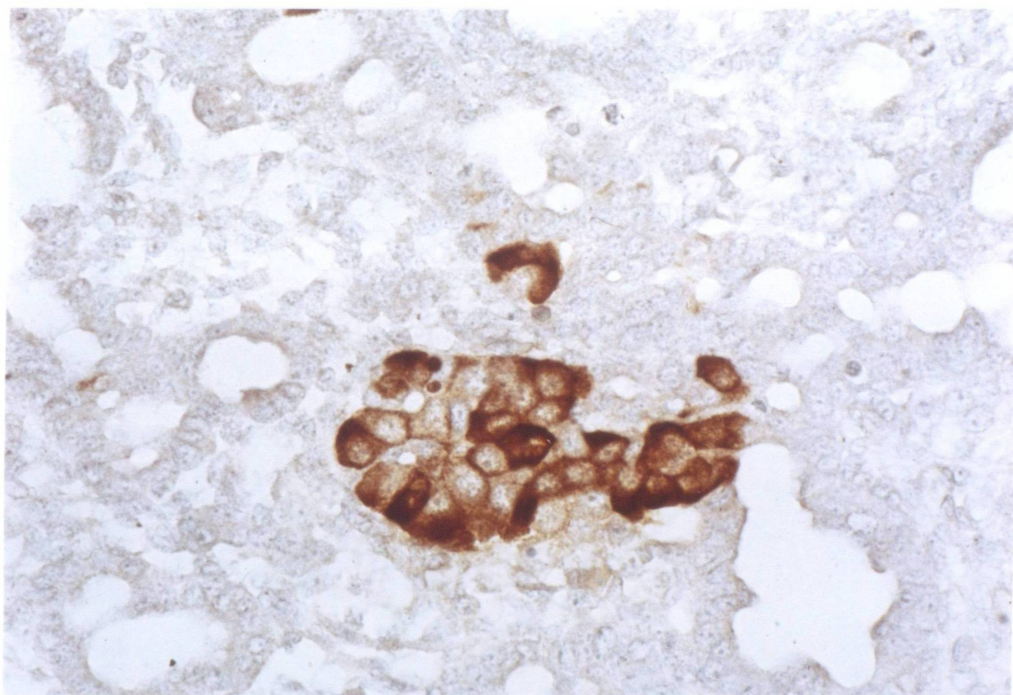


Fig. 23. 胎齡16日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

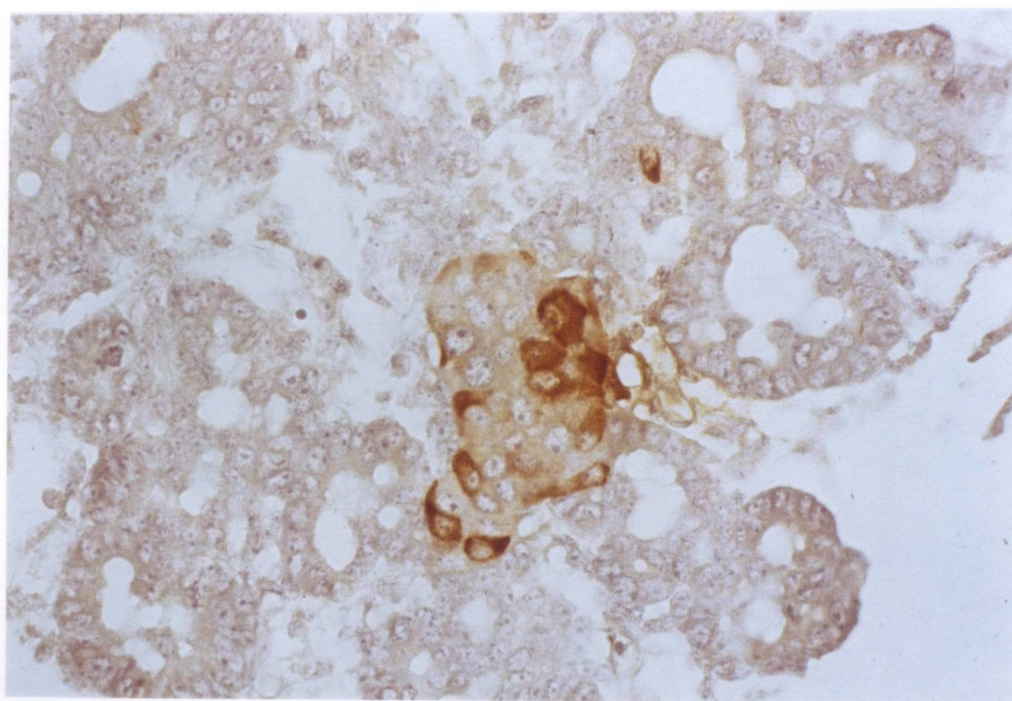


Fig. 24. 胎齡16日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

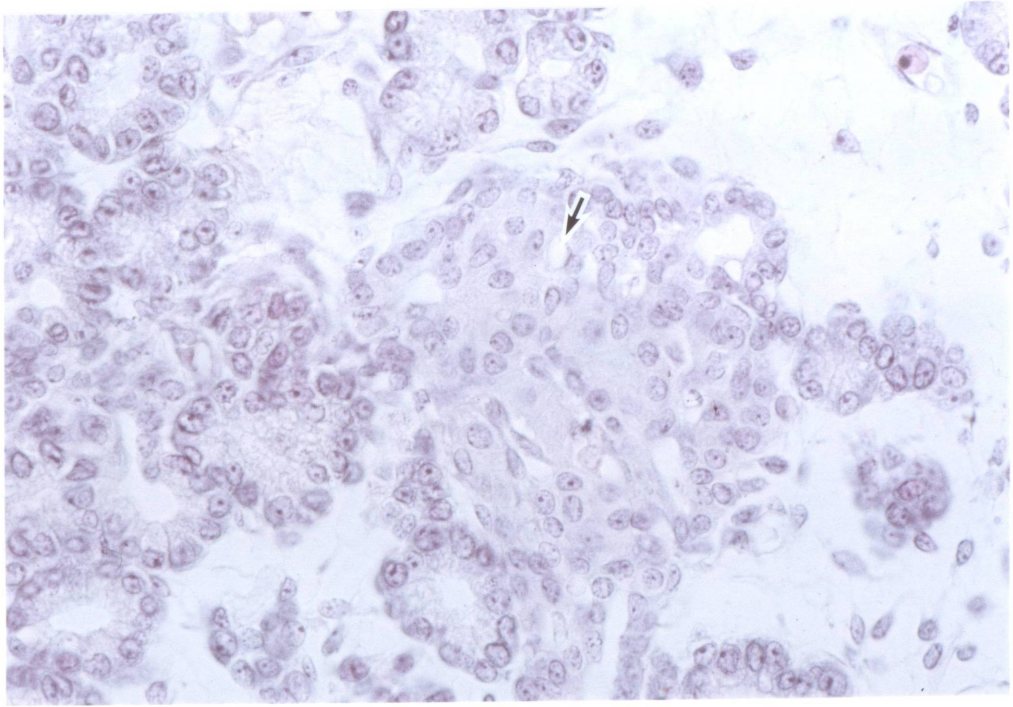


Fig. 25. 胎齡18日の膵臓、H-E染色、x470  
矢印：毛細血管

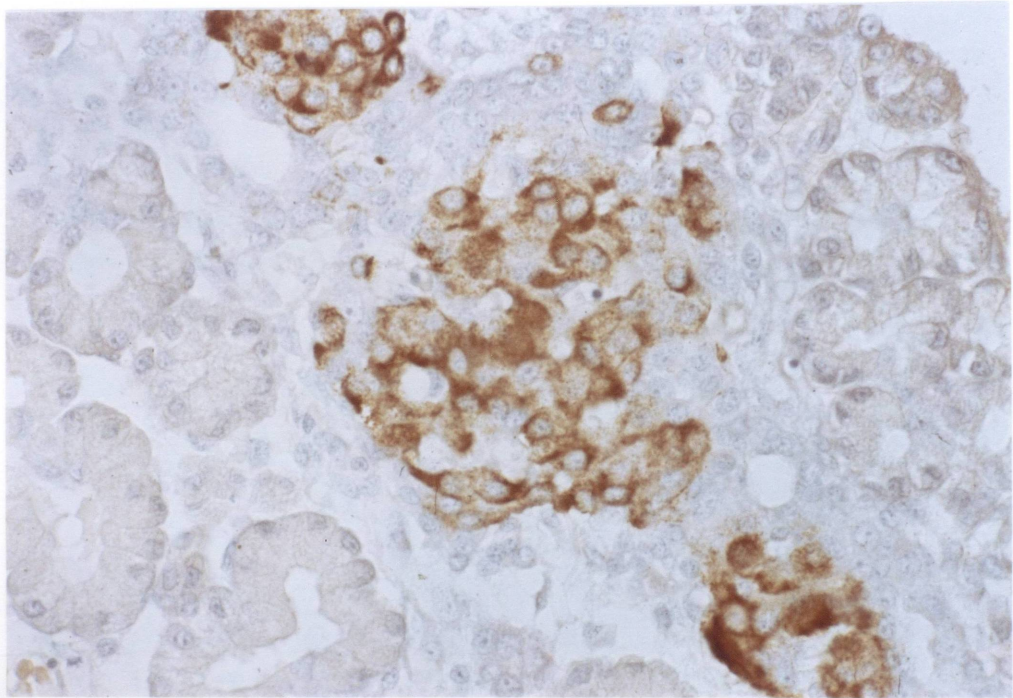


Fig. 26. 胎齡18日の膵臓、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

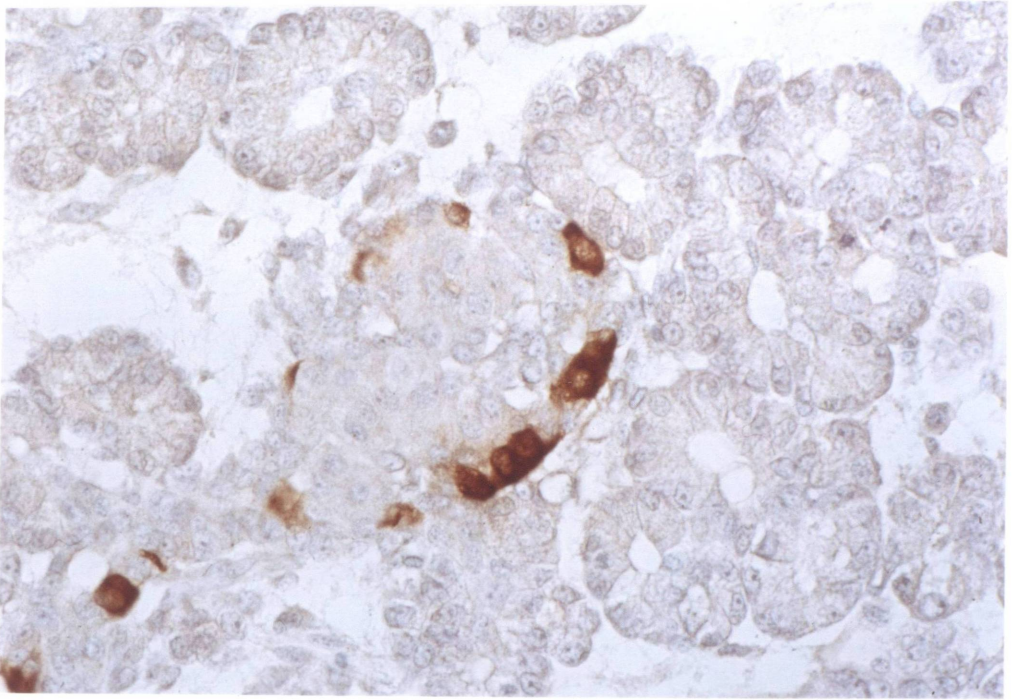


Fig. 27. 胎齡18日の膵臓、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

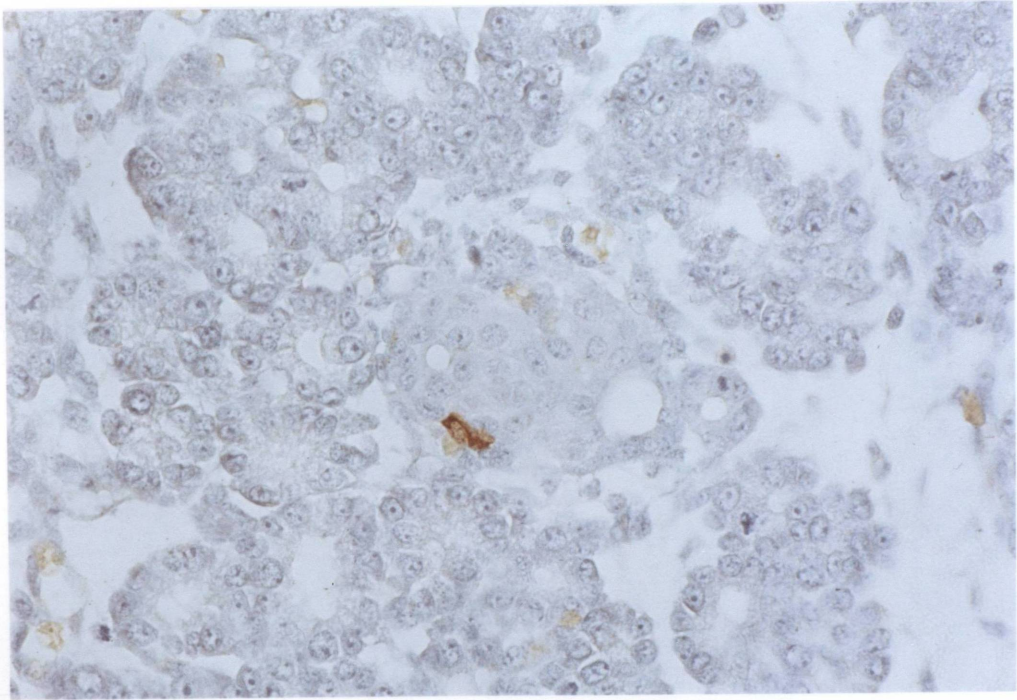


Fig. 28. 胎齡18日の膵臓、抗ソマトスタチン血清を用いた免疫染色、x470

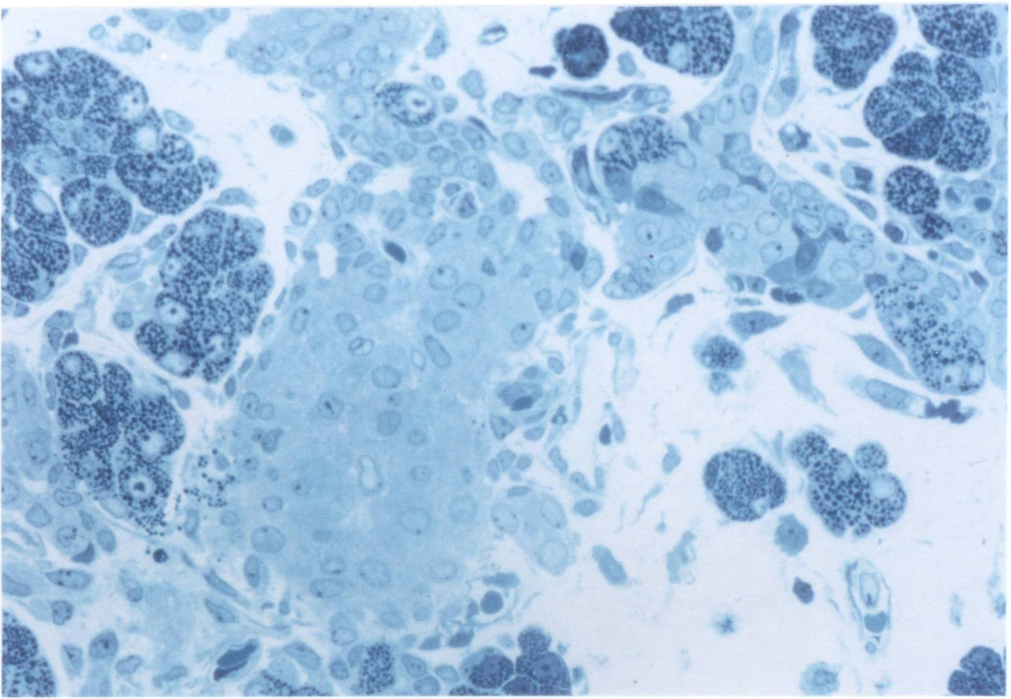


Fig. 29. 胎齡21日の膵臓、メチレンブルー染色、x470

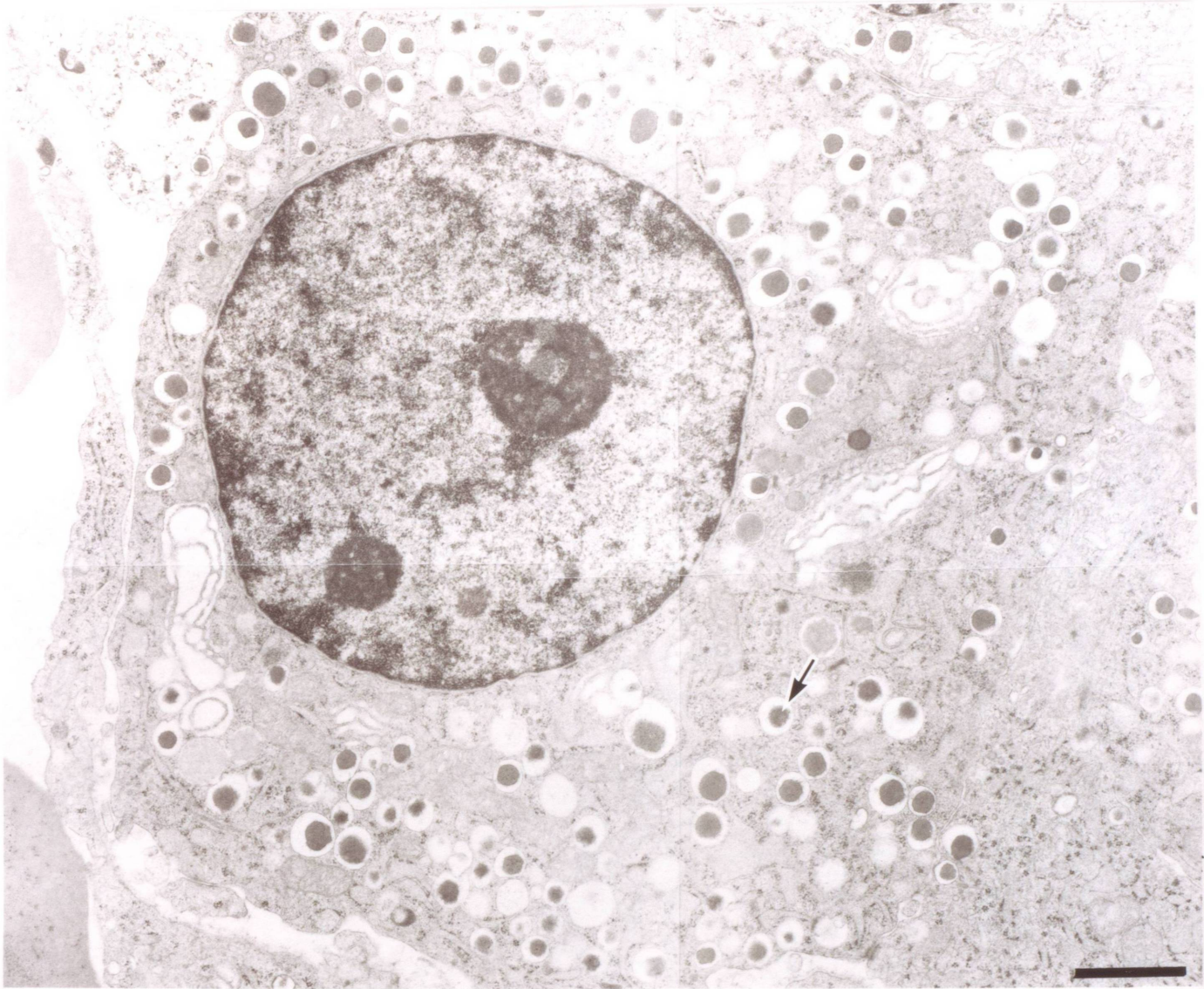


Fig. 30. 胎齡21日のインシュリン産生細胞、x16000  
矢印：インシュリン顆粒  
右下のバー：1 $\mu$ m

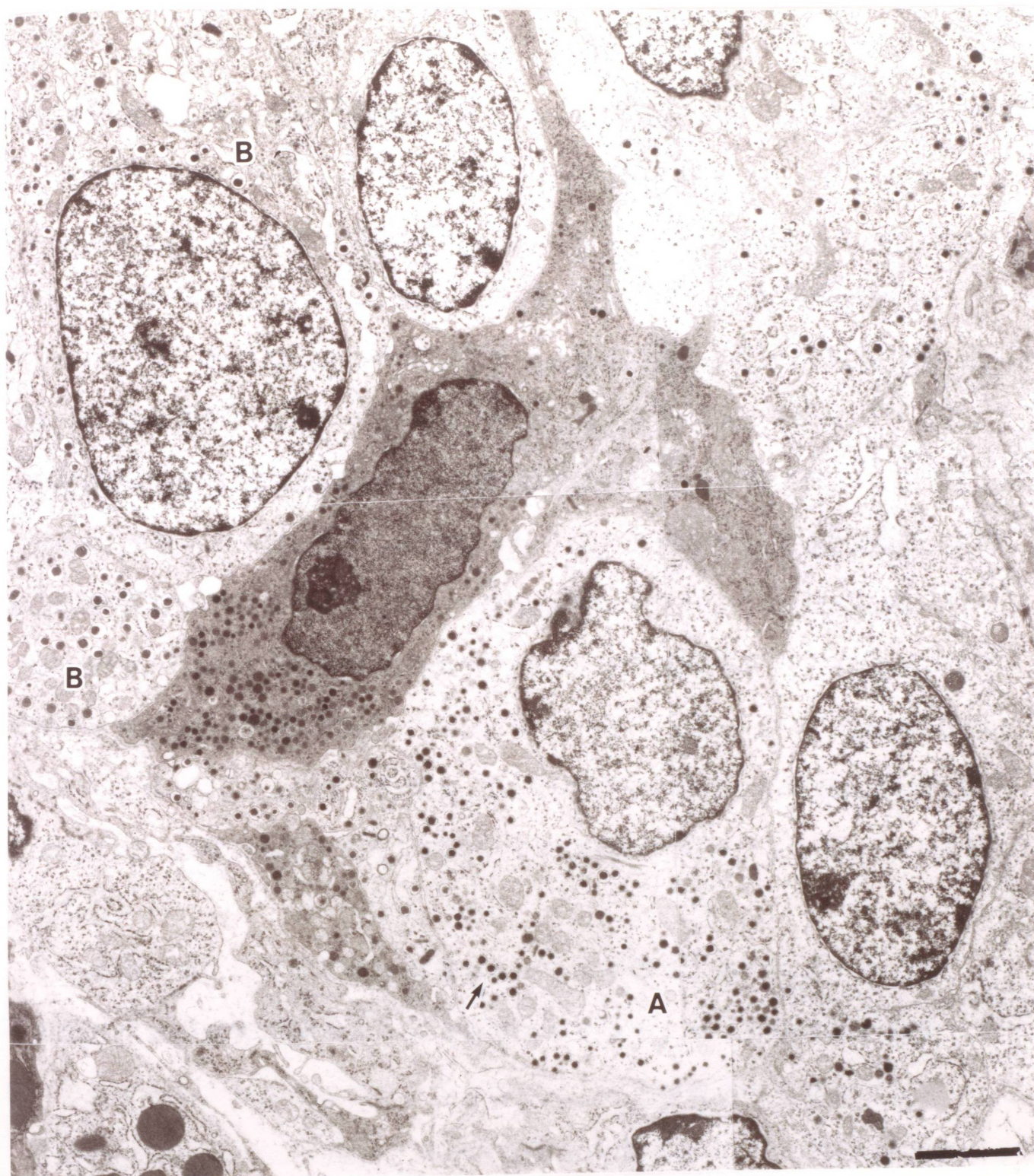


Fig. 31. 胎齡21日のグルカゴン産生細胞、x9000

矢印：グルカゴン顆粒

A：A細胞

B：B細胞

右下のバー：2 $\mu$ m

## 第二章 膵島細胞の分化に対する母体副腎除去の影響

副腎皮質ホルモンは、鶏胚網膜 (Jones & Moscona, '74)、鶏胚皮膚 (Sugimoto et al., '74)、ラット肝臓 (Eisen et al., '73 ; plas et al., '73)、ウサギ肺 (Ballard & Ballard, '72) およびマウス乳腺 (Mills & Topper, '70) など、種々の動物組織の発生に関与していることが知られている。これらの組織において、副腎皮質ホルモンはタンパクの蓄積の促進や、細胞内小器官の分化を引き起こしている。

胎子膵臓内分泌部の発生に対する副腎皮質ホルモンの影響は、主に *in vitro* の実験によって、特にB細胞について研究されている。発生中のラット胎子膵臓を固形培地で培養すると、B細胞は顆粒を持たずに発生するが (Zagury, '59)、同様の培養条件で発生中の膵臓と副腎を共培養すると、顆粒を持ったB細胞が発生する (Zagury, '59 ; Zagury, '61)。しかしながら、Wells et al. ('68) は、液体培地で発生中の膵臓と副腎を共培養しても、副腎はB細胞の分化に対して促進効果も抑制効果も持たないと報告した。

また膵臓の発生に対する副腎皮質ホルモンの影響は、器官培養を用いて、げっ歯類の主要な副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンを培養液に添加して調べられている。コルチコステロンが濃度によっては膵島の発育を刺激し

(McEvoy et al., '76)、膵島の発育を刺激するホルモン濃度は膵島からのグルカゴン分泌を抑制 (McEvoy, '80) するが、ソマトスタチン分泌を促進 (McEvoy et al., '81) することは緒言でも触れた。これらの報告は全て *in vitro* で行われており、使用した胎子の16日以降である。第一章で述べた通り、胎生期後半では膵島細胞は細胞の分化がある程度完了しており、



この期間は膵島細胞の分化の時期というよりは、膵島が発育増大する時期である。そこで本章では胎生中期の膵島細胞の分化に対する副腎皮質ホルモンの影響を *in vivo* で調べることを計画した。ラットの胎子自身の副腎は胎齢17日にコルチコステロンを分泌すると報告されている (Cohen, '73)。副腎皮質ホルモンは胎盤を通過するので (Dupouy et al., '75 ; Kamoun, '70 ; Zarrow et al., '70)、膵臓の初期発生に副腎皮質ホルモンが関与するならば、その影響は母体の副腎皮質ホルモンによるものと考えられる。そこで、妊娠6日目に母体の副腎を除去し、膵臓が発育を開始する時期に胎子の環境下に副腎皮質ホルモンがない状況を作成して、その胎子膵島の発達状態を無処置群の胎子膵島の発育と比較した。すなわち膵臓発生の初期の段階 (胎齢12~16日) の胎子を用い、免疫組織化学的手法を用いて各膵島細胞の分化の状態を観察した。また、母体副腎を除去した胎子膵島の発育に変化が見られた場合、その変化が副腎皮質ホルモンの欠乏によるものか、あるいは他の要因によるものであるかを確かめるため、母体の副腎除去したものにコルチコステロンを投与した群も設けて併せて検討した。

## 第一節 材料および方法

### 1) 使用動物

本章で用いた動物は、第一章で用いたものと同様である。

妊娠したラットは無処置のコントロール群、妊娠6日目に母体の副腎を除去した群 (Adx群)、そして妊娠6日目に母体の副腎を除去し、剖検日までコルチコステロンを母体に連日皮下投与した群 (Adx+cort群) の3群に分けた。

妊娠6日目に母体の両側の副腎除去を行い、妊娠12、13、14、15および16日に剖検した。

副腎除去はエーテル麻酔のもとに背腰部から行った。副腎除去が完全に行われているかどうかを剖検時に確認した。また剖検時、母体の腹大動脈から採血し、血清コルチコステロン濃度をRat corticosterone [ $^{125}\text{I}$ ] assay system (Amersham) を用いてラジオイムノアッセイ (RIA) 法によって測定した。副腎を除去したラットには、剖検時まで飲料水のかわりに0.9%の食塩水を与えた。副腎除去手術に対する偽手術は行わなかった。また、一部の副腎除去ラットは、ゴマ油に溶解したコルチコステロン懸濁液を投与した。投与したコルチコステロンの濃度は40mg/kgとし、剖検日まで連日皮下投与した。

### 2) 免疫組織化学的観察方法

母体を腹大動脈より採血死させた後、直ちに胎子を子宮から取り出した。胎齢12日および13日の胎子はそのままブアン液で固定した。胎齢14、15および16日の胎子は、体重を測定した後、腸管とともに脾臓を取り出しブアン液で固定した。固定した臓器は常法にしたがいパラプラスチック包埋し、厚さ5 $\mu\text{m}$ の連続切片を作成した。切片は第一章で用いたものと同じ抗体 (抗インシュリン

血清、抗グルカゴン血清、抗ソマトスタチン血清) を用い、免疫染色を施した。抗インシュリン血清、あるいは抗グルカゴン血清を用いて染色した切片は、画像解析装置 (Image Command 5098、オリンパス) を用いて、各抗血清に対する陽性細胞の総面積を算出した。そして総面積に切片の厚さ  $5\mu\text{m}$  をかけることで総体積を起算した。また、ソマトスタチン陽性細胞については、その総数を測定した。

### 3) 統計学的処置

得られたデータの解析は、ダンカンの多重検定を用いて行い、 $p < 0.05$  の場合を統計学的に有意差があると判定した。

## 第二節 結果

### 1) 母体血清コルチコステロン濃度

RIA法により測定した母体血清コルチコステロン濃度の結果を表-1、図-32に示した。

本章の実験で用いたRat corticosterone [ $^{125}\text{I}$ ] assay systemの測定範囲は0.78~200ng/mlであるが、Adx群の母体血清コルチコステロン濃度は、測定した全ての妊娠日齢において検出されなかった。

### 2) 胎子体重

胎齢14~16日の胎子体重の測定結果を表-2に示した。

胎子体重は、全ての胎齢において3群間に有意差は認められなかった。

### 3) インシュリン陽性細胞の分化に対する母体副腎除去の影響

胎齢12~16日の胎子インシュリン陽性細胞の総体積を表-3、図-33に示した。

胎齢12日において、母体を副腎除去した胎子では、インシュリン陽性細胞はわずかしか存在せず(図-34)、インシュリン陽性細胞総体積はコントロール群と比べ有意に減少していた。副腎除去した母体に毎日コルチコステロンを投与すると、胎子のインシュリン陽性細胞総体積はコントロール群のレベルとほぼ同じであった。

胎齢13日および14日においても胎齢12日と同様、母体を副腎除去した胎子のインシュリン陽性細胞総体積は減少し、コントロール群との間に有意な差が認められた(図-35、36)。一方、Adx+cort群の胎子インシュリン陽性細

胞総体積は、コントロール群のレベルとほぼ同じであった。

胎齢15日において、母体が副腎除去されると、胎子のインシュリン陽性細胞総体積はより若い胎齢の場合と同様、コントロール群と比べ有意に減少した(図-37)。しかしながら、副腎除去した母体に連日コルチコステロンを投与しても、Adx+cort群とAdx群との間には有意な差は認められなかった。

胎齢16日において、胎子体重は胎齢15日のおおよそ1.5~2倍に増加したが、インシュリン陽性細胞総体積は胎齢15日のおおよそ7.5~10倍に激増した。この胎齢では、3群の総体積の間に有意な差は認められなかった(図-38)。

#### 4) グルカゴン陽性細胞の分化に対する母体副腎除去の影響

胎齢12~15日の胎子グルカゴン陽性細胞の総体積を表-4、図-39に示した。

胎齢12日および13日において、胎子グルカゴン陽性細胞総体積は、コントロール群、Adx群およびAdx+cort群の3群の間に有意な差は認められなかった。

胎齢14日において、母体を副腎除去した胎子のグルカゴン陽性細胞総体積は、コントロール群と比べ有意に増加していた(図-40)。しかしながら、Adx+cort群の胎子グルカゴン陽性細胞総体積は、コントロール群と同程度であった。

胎齢15日においては、胎子のグルカゴン陽性細胞総体積は3群間において有意な差は認められなかった。

#### 5) ソマトスタチン陽性細胞の分化に対する母体副腎除去の影響

胎齢12~16日の胎子ソマトスタチン陽性細胞の総数を表-5、図-41に示

した。

胎齢12～16日において、胎子のソマトスタチン陽性細胞総数はコントロール群、Adx群およびAdx+cort群の3群間において差は認められなかった。

### 第三節 考察

妊娠期間中、副腎皮質ホルモンは胎盤経由で母体から胎子へ、胎子から母体へと移行する (Dupouy et al., '75 ; Kamoun, '70 ; Zarrow et al., '70)。本章の実験では、妊娠6日目に母体の副腎を除去した。これら副腎を除去した妊娠ラットでは、妊娠12~15日の間血清コルチコステロンが検出されなかったことから本実験で用いたAdx群において、母体側の皮質ホルモンの供給源は根絶されたと考えられる。ラットでは、胎子の血漿中にコルチコステロンが初めて検出されるのは胎齢17日 (Cohen, '73) であるので、本章の実験において臍臓を観察した期間 (胎齢12~16日) およびそれ以前の数日間は、胎子は副腎皮質ホルモンの影響をほとんど受けていないと考えることができる。したがって本実験において、胎齢12~15日のAdx群の胎子のインシュリン陽性細胞総体積がコントロール群のそれに比べて有意に減少し、さらに胎齢12~15日のAdx+cort群の陽性細胞総体積がコントロール群の体積とほぼ同じレベルになったことから、Adx群で観察されたインシュリン陽性細胞総体積の減少の主な原因は、母体副腎除去による副腎皮質ホルモンの欠乏によるものと考えられる。この副腎皮質ホルモンの欠損が、胎子の成長遅延を引き起こし、その結果、胎子臍島インシュリン陽性細胞の発達が妨げられたものではないかという可能性も考えられるが、胎子体重がいずれの胎齢においても3群間に有意差が認められなかったことから、この考えは除外しても良いと考えられる。

インシュリン陽性細胞の分化に対して母体副腎除去が抑制的に影響したのに反して、ソマトスタチン陽性細胞の分化に対して、母体副腎除去は影響しなかった。しかし、グルカゴン陽性細胞に関しては、母体の副腎除去は胎齢14日

のみ総体積の増加を引き起こした。

第一章および本章の実験結果から、胎生期における膵島細胞、特にA細胞とB細胞は分化のパターンが異なることが明らかとなった。膵島細胞の中で一番最初に分化が始まるA細胞は、胎齢11日に出現し、翌日にはその体積が急増し、14日までは一定であるが、15日に体積は倍増していた。本実験では計測していないが、胎齢17日以降から出生前まで、A細胞の体積は後述するB細胞ほどではないが、直線的に増加するという (Kaung, '94)。しかし膵臓に含まれるグルカゴン容量は、胎齢12日から16日の間は高いレベルであるが、それ以降漸減するという報告がある (Rall et al., '73)。ただし胎子血中にいつからどの程度のグルカゴンが分泌されるかについての詳細はいまだ分かっていない。一方、B細胞の分化の過程は3段階であると考えられている

(Lacy & Greider, '79)。つまり胎齢12~15日、15~20日、20~出産までであるようだ。実際にB細胞の体積の変化に注目すると、本実験でも胎齢15日までB細胞の体積は少しながら増加するが、A細胞の総体積の15.6% (胎齢12日) から23.4% (胎齢15日) しか存在しない。ところが胎齢16日にB細胞総体積は急増し、それ以降、胎齢末期に向けて指数的に増加する。インシュリンが膵臓組織内に初めて出現するのは、免疫組織学的に検出可能な胎齢より早期の胎齢11日であると報告されている (Rall et al., '73)。膵臓内のインシュリンは胎齢12日に急増するが、それ以降胎齢15日まで一定であり、胎齢16日から19日にかけて体積の増加のパターンと平行に、指数的に増加する (Rall et al., '73)。このようにA細胞とB細胞の分化の様式は大きく異なっているが、B細胞ばかりでなくA細胞も胎齢15日前後が細胞分化の転換期であると思われる。本章の実験において、母体の副腎除去は胎齢12~15日の胎子B細胞の総体積を減少させたが、胎齢16日のB細胞総体積には何



ら影響を及ぼさなかった。前述したB細胞の増加および膵臓インシュリン量の変化を併せて考えると、胎齢12～15日のB細胞の分化（あるいは発達）は緩やかであるので、母体由来の副腎皮質ホルモンの影響が明確に体積の減少として現れたのに対し、胎齢16日以降はそれまで抑制気味であったB細胞の発達－分化よりは発達あるいは増殖という言葉が適すると思われる－がまるでストッパーをはずしたように急速に進行し、母体由来の副腎皮質ホルモンの欠落の影響にまさる様な細胞の増殖が起きているように思われる。言い換えれば、胎齢12～15日はB細胞の前駆細胞の分化が進行する時期であり、16日以降は幹細胞の役割であるところのB細胞前駆細胞が一気に、急速に細胞分裂を遂行する時期であるかも知れない。

インシュリンとグルカゴンの生理的な作用は互いに拮抗的である。膵島内での血液の流れと膵島細胞の配列について考察している論文（Bonner-Weir & Orci, '82）によると、膵島に侵入してきた血液はまずB細胞の集団の間を通過し、次いでA細胞とD細胞の集団の中を通り抜ける。したがって、B細胞から多量のインシュリンが分泌されればA細胞は即座にそれを感じし、グルカゴンの分泌を抑えるという。胎齢14日に膵島B細胞がインシュリンを分泌しているかどうかは不明であるが、本章の実験で胎齢14日のAdx群のA細胞総体積が増加したのは、Adx群のB細胞の体積が減少し、その結果インシュリンの分泌が抑制され、この血中インシュリンレベルの低下を同じ膵島内のA細胞が感知し、グルカゴンの分泌量を増加させるためにA細胞の体積が増加した可能性もある。Adx群のA細胞総体積が増加したのは胎齢14日のみであることから、胎生期のインシュリンとグルカゴンのパラクリン（傍分泌）が実質的に機能し始めるのは胎齢13ないし14日であるかも知れない。しかしながら胎齢15日以降AdxがA細胞総体積を変化させなかったのは、前述したように膵島細胞の分

化は胎齡15日を轉換期としているようなので、A、B兩細胞の體積およびホルモン含有量が急激に変化するため、母體由來の副腎皮質ホルモンの欠落の影響は膵島内の大きな変化の影に隠れてしまったのかも知れない。

#### 第四節 小括

妊娠6日に母体の副腎を除去し、胎齡12～16日の胎子膵島の発達を免疫組織化学的に観察し、各膵島細胞の体積を計測あるいは細胞数をカウントした。母体の副腎を除去すると胎齡12～15日の胎子膵島インシュリン陽性細胞の総体積は減少した。この減少は副腎を除去した母体へコルチコステロンを連日投与することにより阻止された。グルカゴン陽性細胞に対しては、母体の副腎除去は胎齡14日のみ、胎子膵島グルカゴン陽性細胞の総体積を増加させた。ソマトスタチン陽性細胞総数は母体の副腎除去による影響を受けなかった。これらの所見は、妊娠初期の母体の副腎除去は、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化を抑制し、その主な要因は母体由来の副腎皮質ホルモンの欠損であることを示唆している。また母体の副腎除去はインシュリン陽性細胞に対する影響とは異なり、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の分化には関与しないと思われる。

Table 1. Maternal serum corticosterone concentration( mean±S.E.M. )

Gestational days	Group	No. of samples	Concentration ( ng/ml )
12	Control	5	336±116
	Adx	5	undetectable
	Adx+cort	5	1032±189 *
13	Control	5	470±152
	Adx	5	undetectable
	Adx+cort	5	842±116 *
14	Control	5	562± 65
	Adx	5	undetectable
	Adx+cort	5	697± 58
15	Control	5	639±173
	Adx	5	undetectable
	Adx+cort	5	1136±147 *

\*Significantly different from the control group (  $p < 0.05$  ).

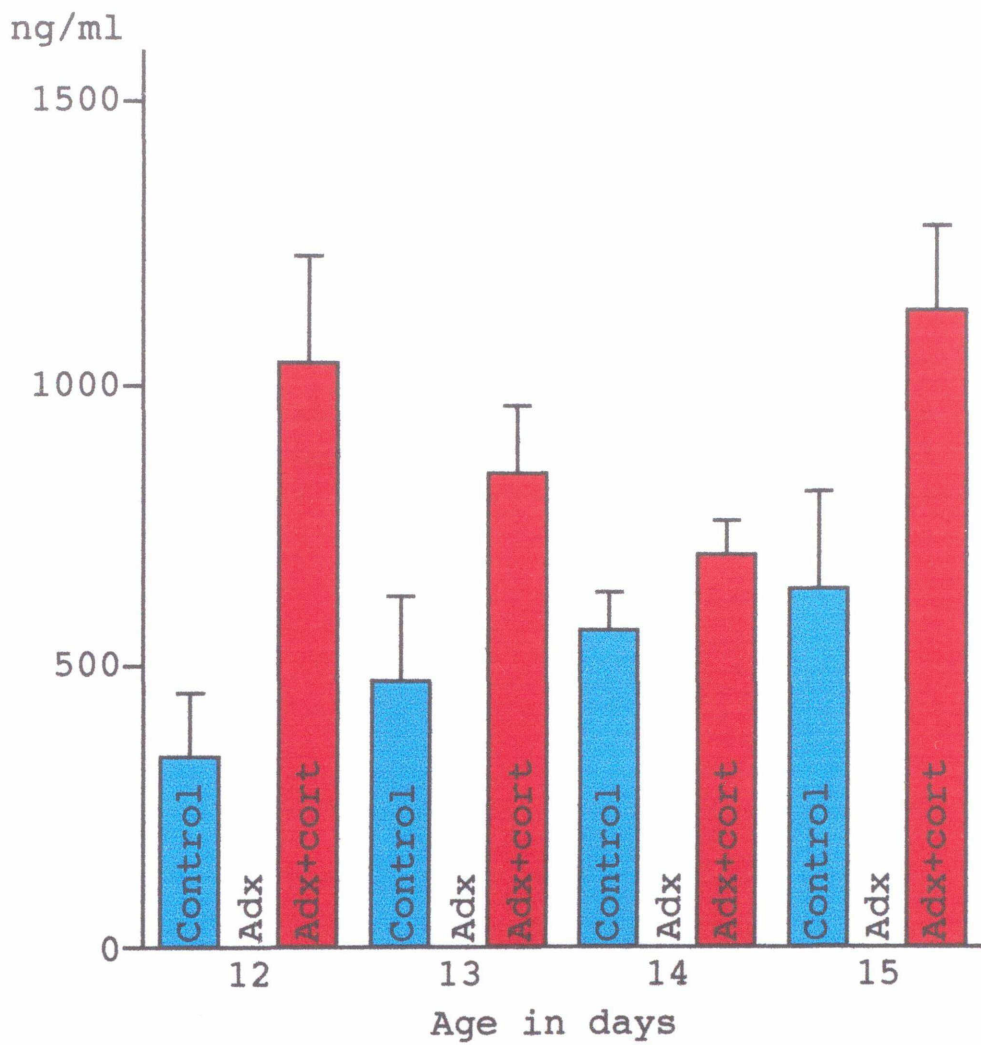


Fig. 32. Maternal serum corticosterone concentration

Table 2. Fetal body weights ( mean $\pm$ S.E.M. )

Age in days	Group	No. of samples ( litters )	Body weight ( mg )
14	Control	33(5)	153 $\pm$ 2
	Adx	30(5)	149 $\pm$ 2
	Adx+cort	27(5)	151 $\pm$ 3
15	Control	32(5)	271 $\pm$ 3
	Adx	28(5)	275 $\pm$ 5
	Adx+cort	31(5)	279 $\pm$ 5
16	Control	18(4)	445 $\pm$ 7
	Adx	18(4)	425 $\pm$ 9
	Adx+cort	17(4)	428 $\pm$ 7

Table 3. Collective volume of insulin-positive cells ( mean±S.E.M. )

Age in Days	Group	No. of samples (litters)	V. of insulin-positive cells (×1000 μ m <sup>3</sup> )
12	Control	11(4)	7.8± 0.9
	Adx	13(3)	3.3± 0.8 §
	Adx+cort	13(4)	7.0± 0.8
13	Control	13(5)	12.2± 1.3
	Adx	14(5)	6.6± 1.3 §
	Adx+cort	10(3)	10.1± 0.6
14	Control	13(3)	26.9± 2.9
	Adx	11(3)	17.3± 2.0 §
	Adx+cort	10(3)	25.4± 1.2
15	Control	13(4)	46.8± 5.0
	Adx	9(3)	29.9± 4.3 *
	Adx+cort	13(4)	41.6± 3.6
16	Control	10(3)	352.6±62.1
	Adx	9(3)	308.5±41.3 ns
	Adx+cort	8(3)	325.4±28.6

\* Significantly different only from the control group (p<0.05).

§ Significantly different from both the control and the Adx+cort groups(p<0.05).

ns=Not significantly different from both the control and the Adx+cort groups.

$\times 10^4 \mu\text{m}^3$

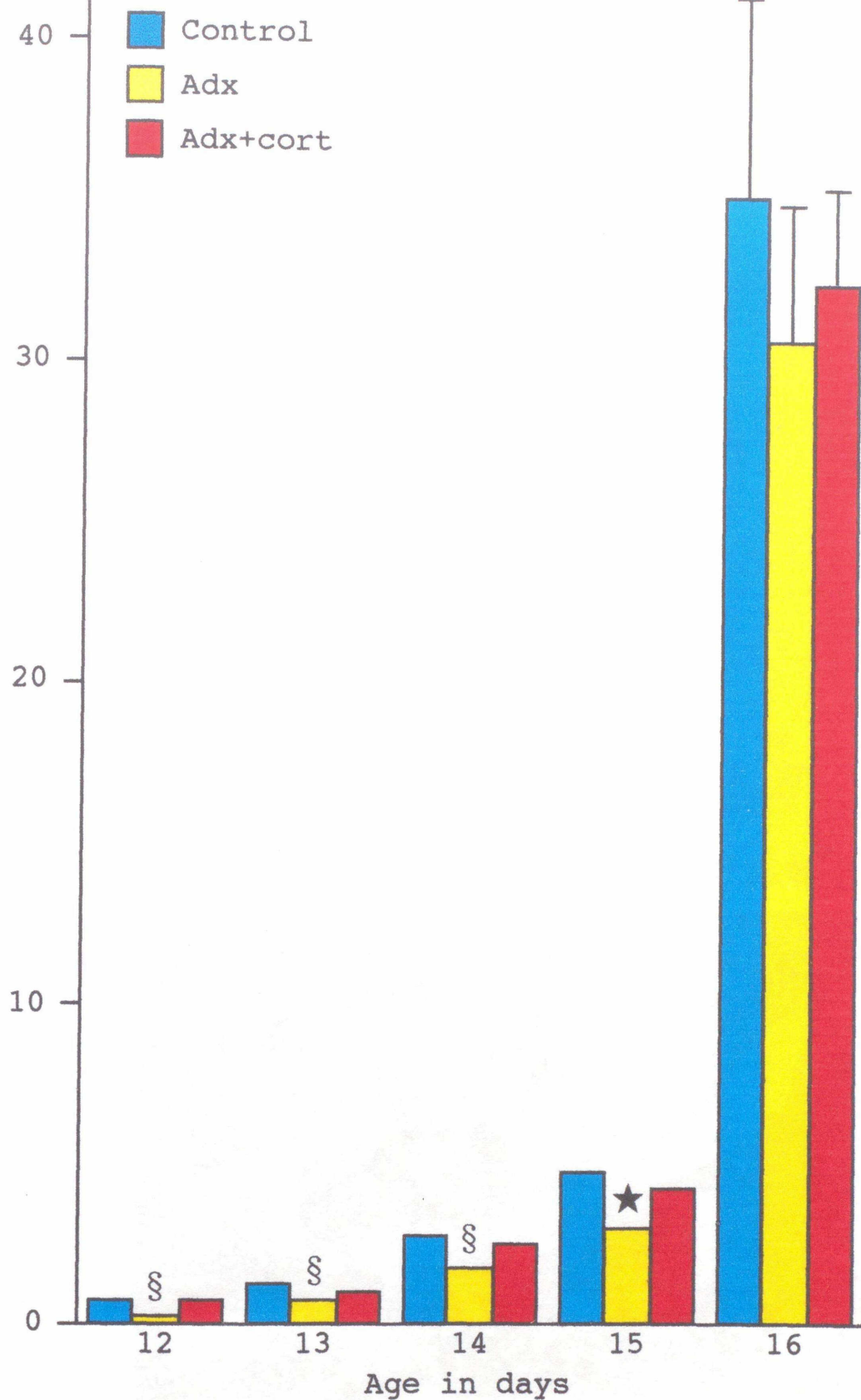


Fig. 33. Collective volume of insulin-positive cells

★ Significantly different only from the control group (  $p < 0.05$  ).

§ Significantly different from both the control and Adx+cort group (  $p < 0.05$  ).



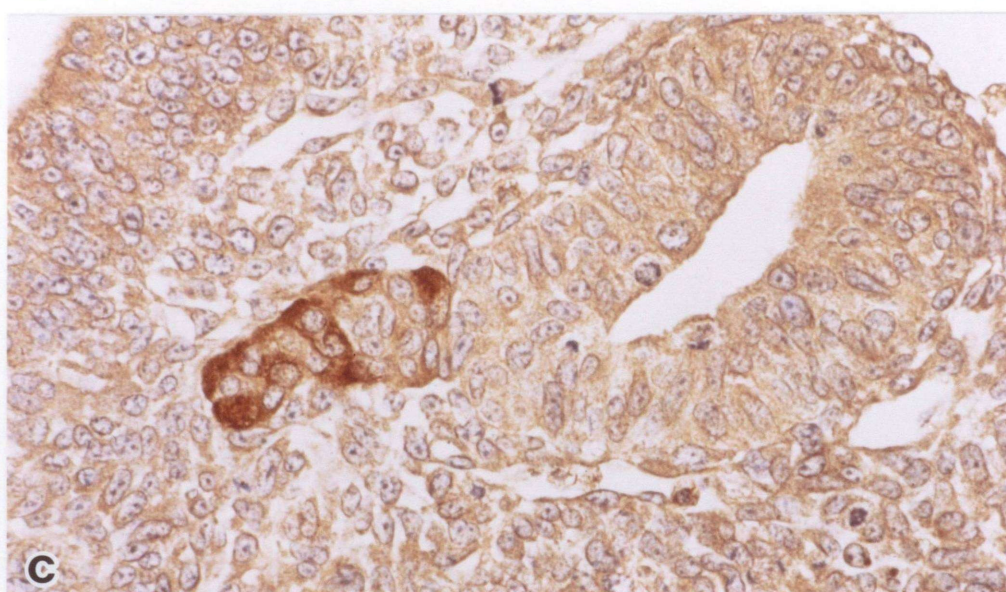
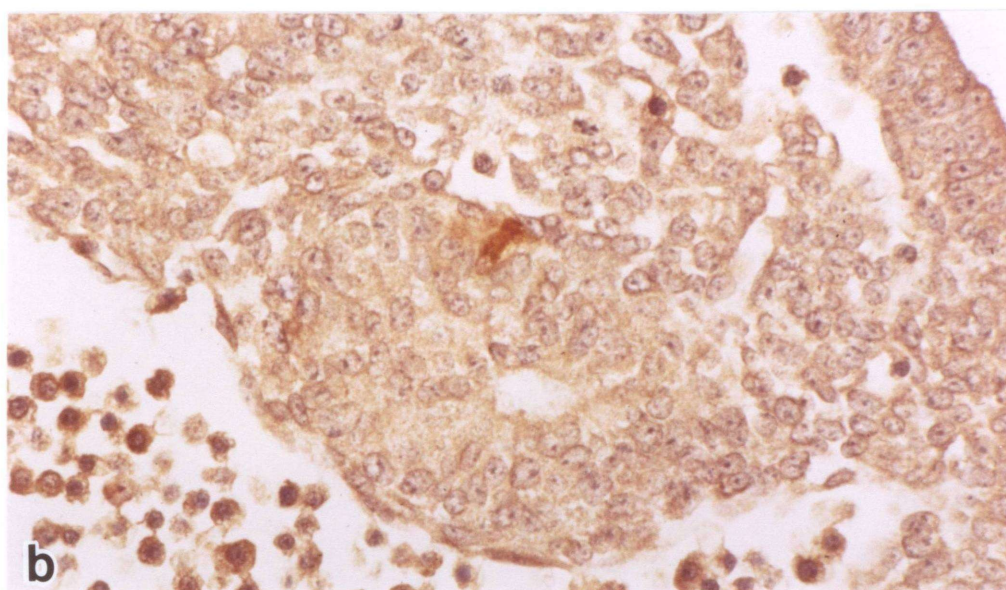
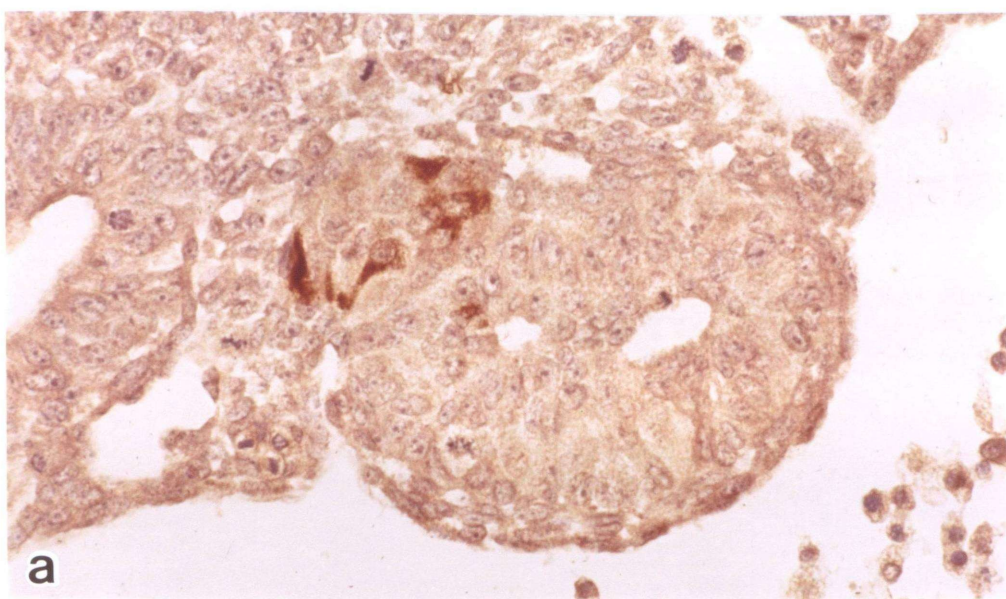


Fig. 34. 胎齡12日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

a : コントロール群

b : Adx群

c : Adx+cort群

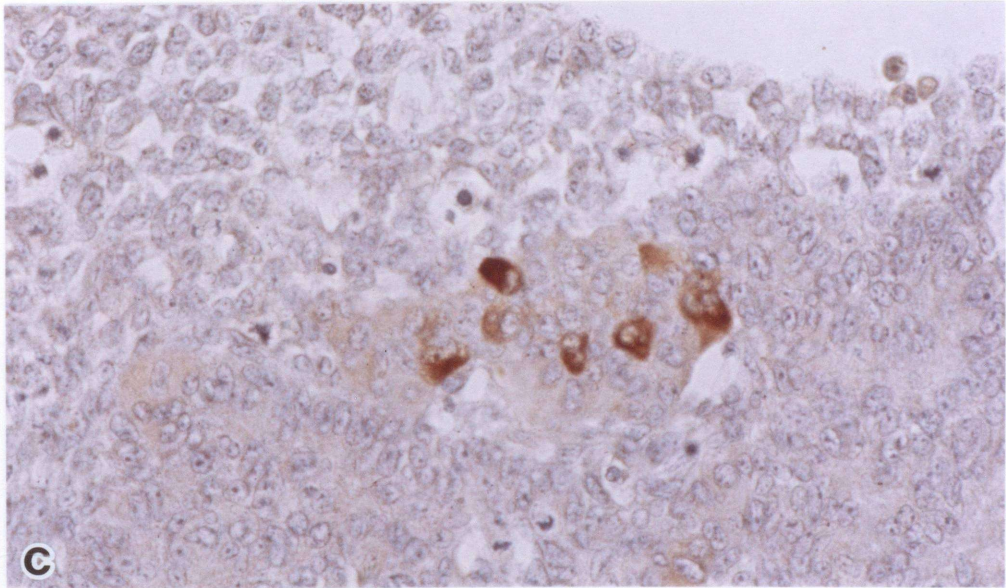
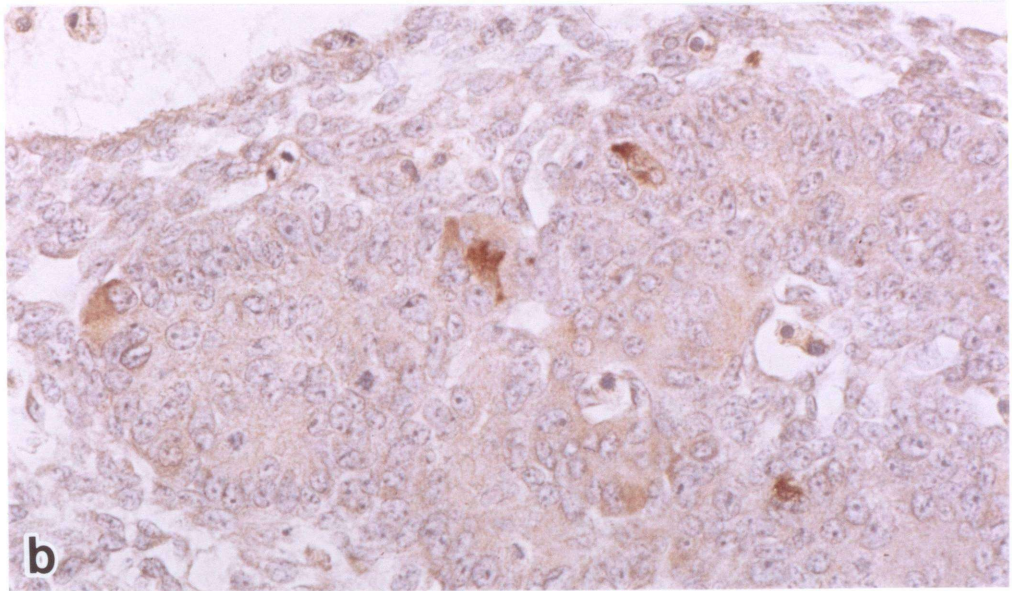
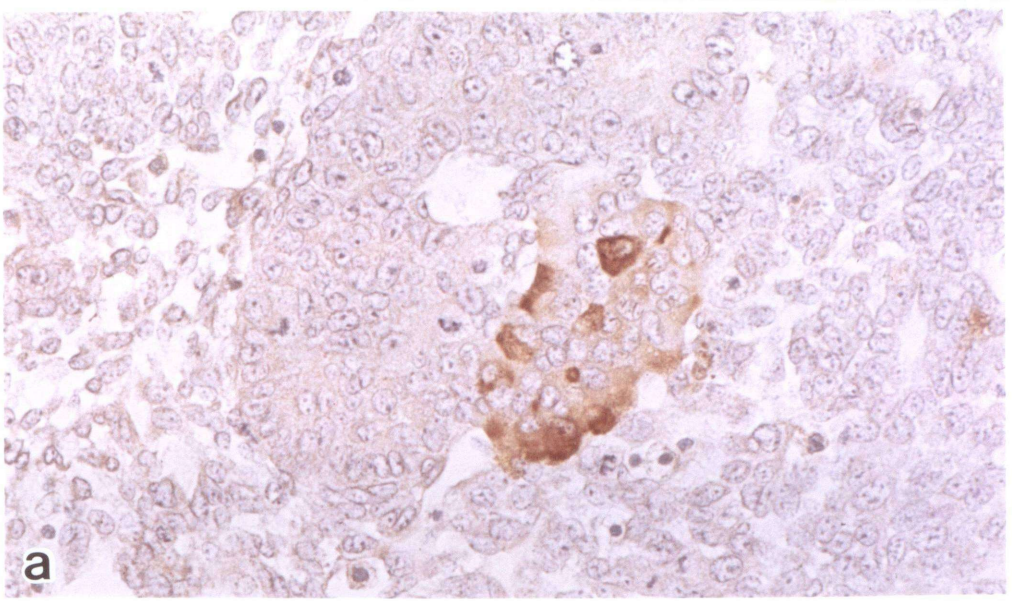


Fig. 35. 胎齡13日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470

a: コントロール群

b: Adx群

c: Adx+cort群

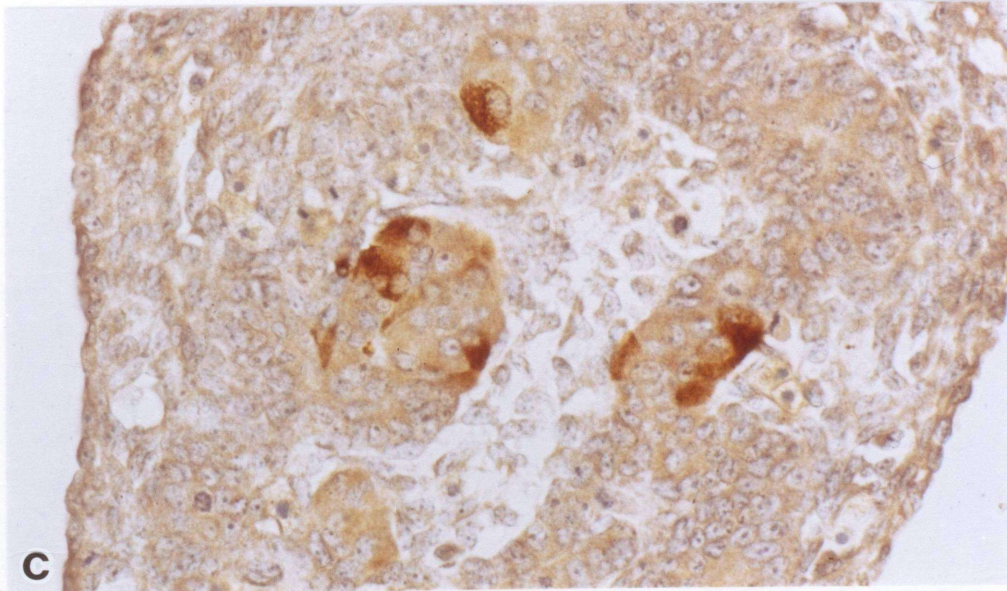
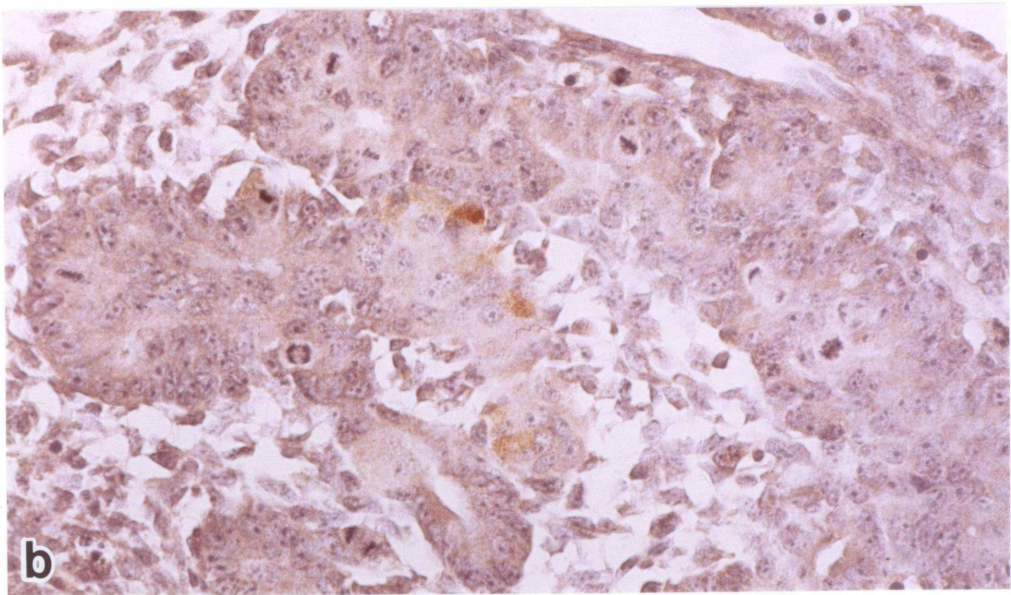
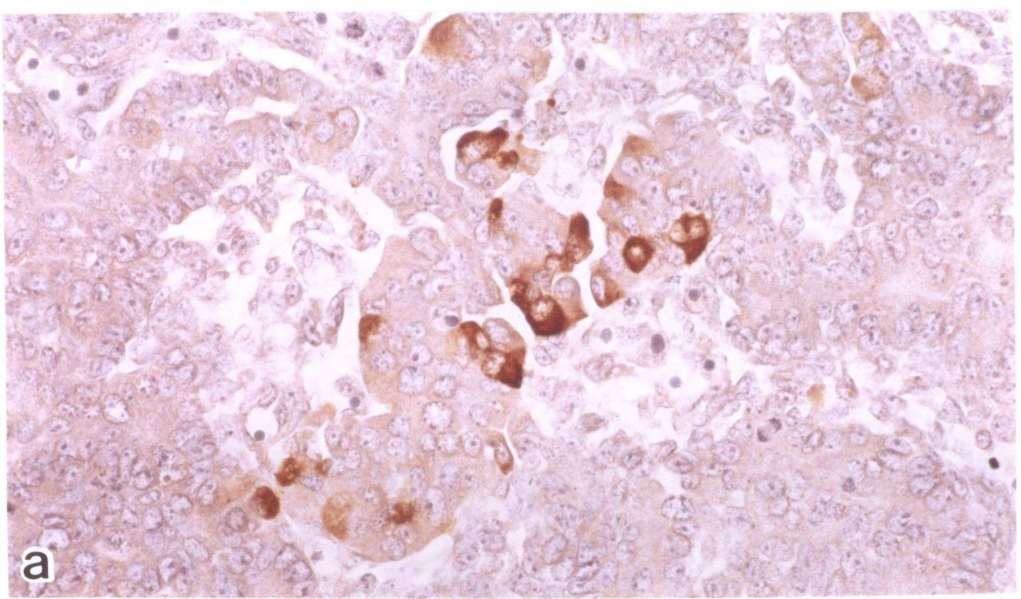


Fig. 36. 胎齡14日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470  
a: コントロール群  
b: Adx群  
c: Adx+cort群

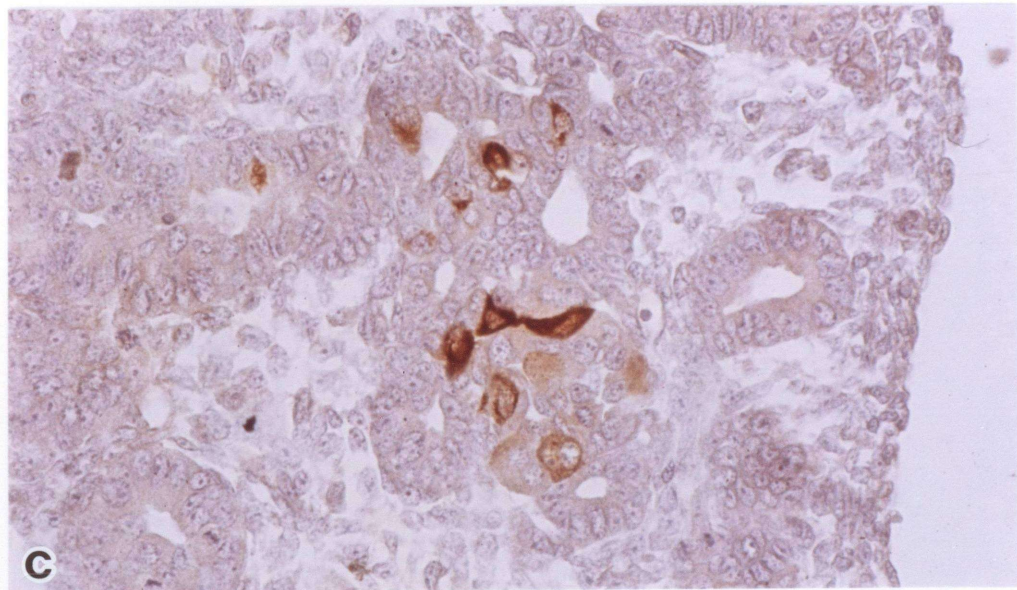
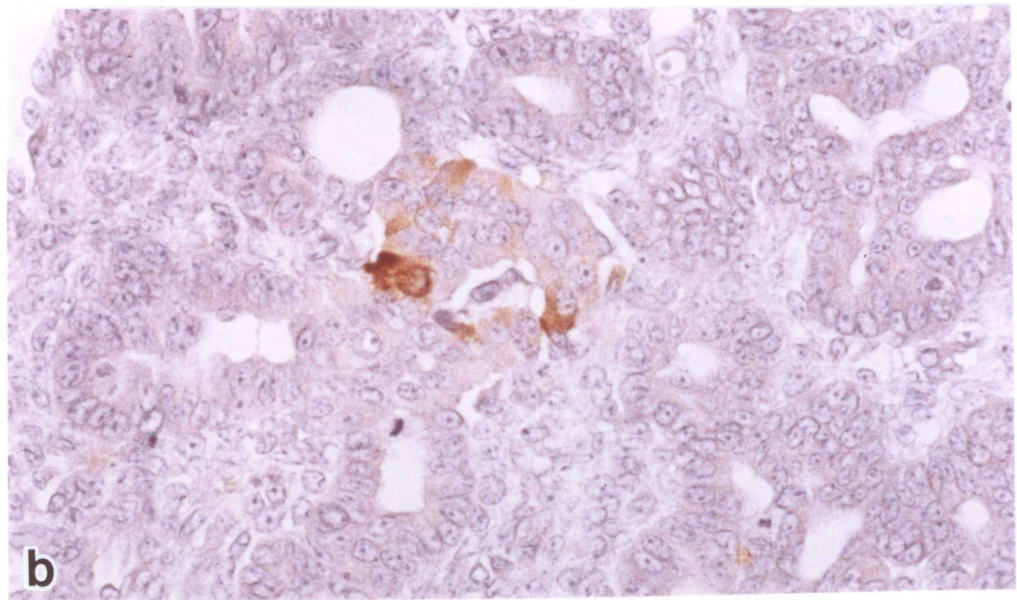
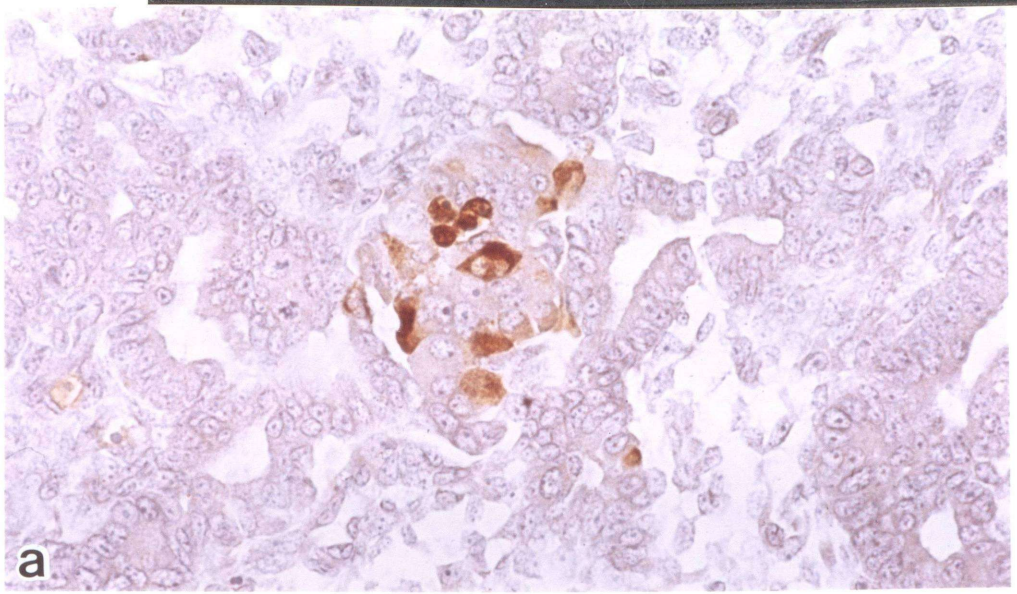


Fig. 37. 胎齡15日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470  
a: コントロール群  
b: Adx群  
c: Adx+cort群

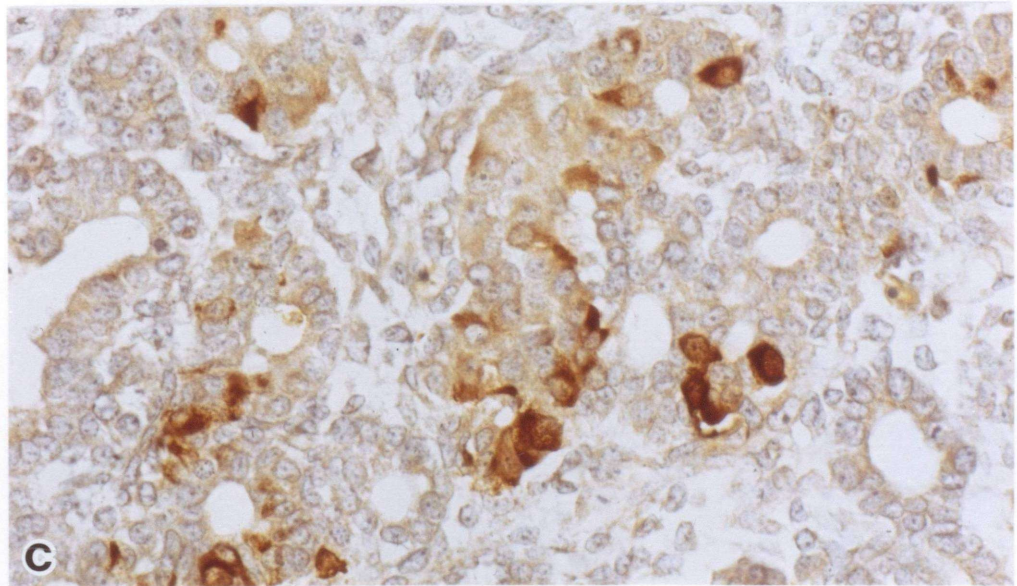
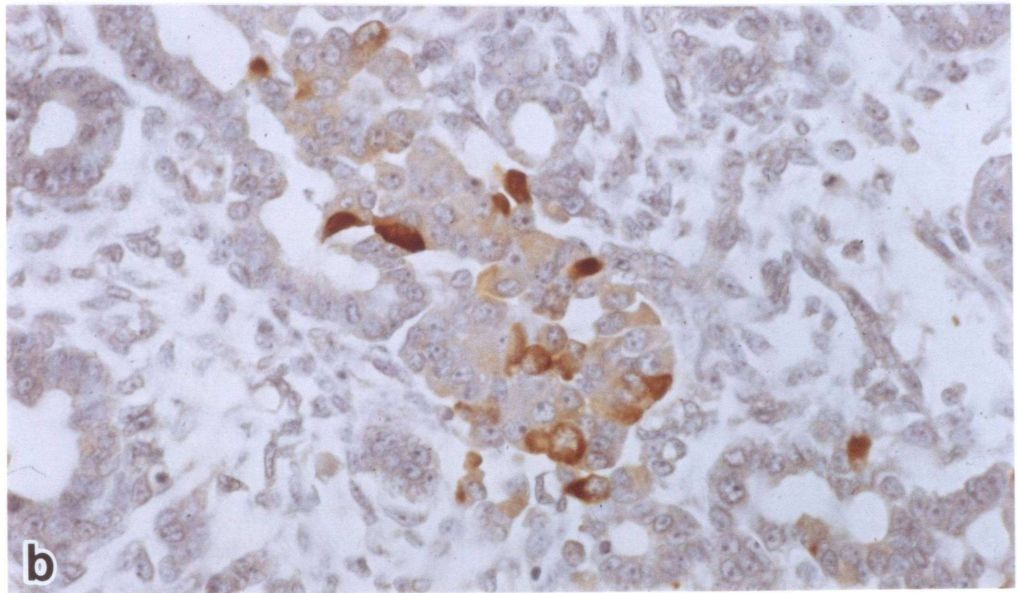
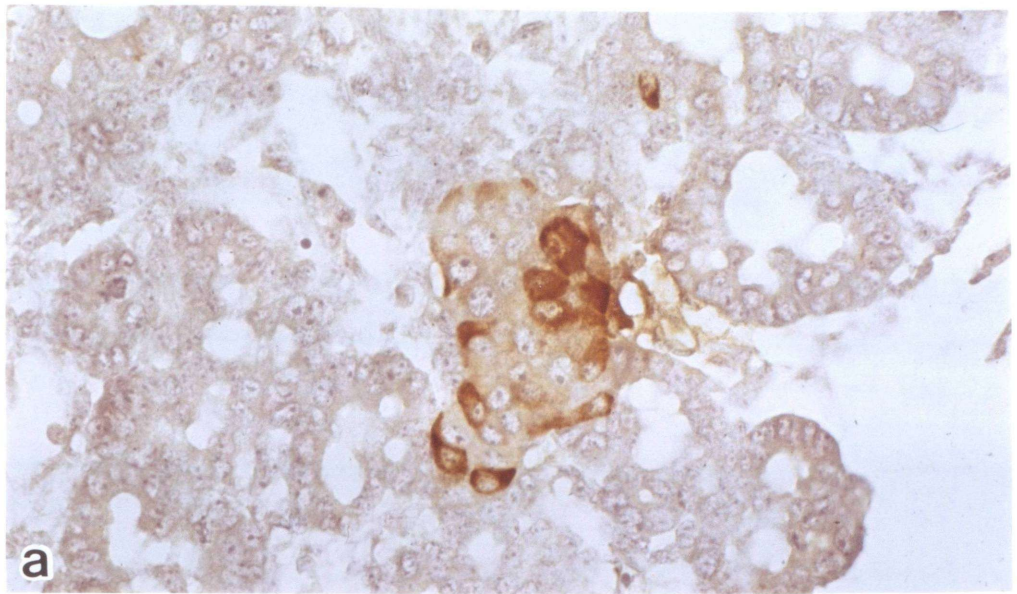


Fig. 38. 胎齡16日の膵臓原基、抗インシュリン血清を用いた免疫染色、x470  
a : コントロール群  
b : Adx群  
c : Adx+cort群

Table 4. Collective volume of glucagon-positive cells ( mean±S.E.M. )

Age in days	Group	No. of samples ( litters )	V of glucagon-positive cells ( $\times 10000 \mu m^3$ )
12	Control	10(4)	5.0±0.4
	Adx	10(3)	5.5±0.3
	Adx+cort	9(3)	5.7±0.4
13	Control	11(3)	8.4±0.7
	Adx	10(3)	8.7±0.5
	Adx+cort	11(2)	7.5±0.6
14	Control	11(4)	9.1±1.0
	Adx	11(3)	13.8±0.8 *
	Adx+cort	9(3)	8.9±1.0
15	Control	11(4)	20.2±2.4
	Adx	11(4)	20.5±1.8
	Adx+cort	11(3)	21.4±0.8

\* Significantly different from both the control and Adx+cort groups (  $p < 0.05$  ).

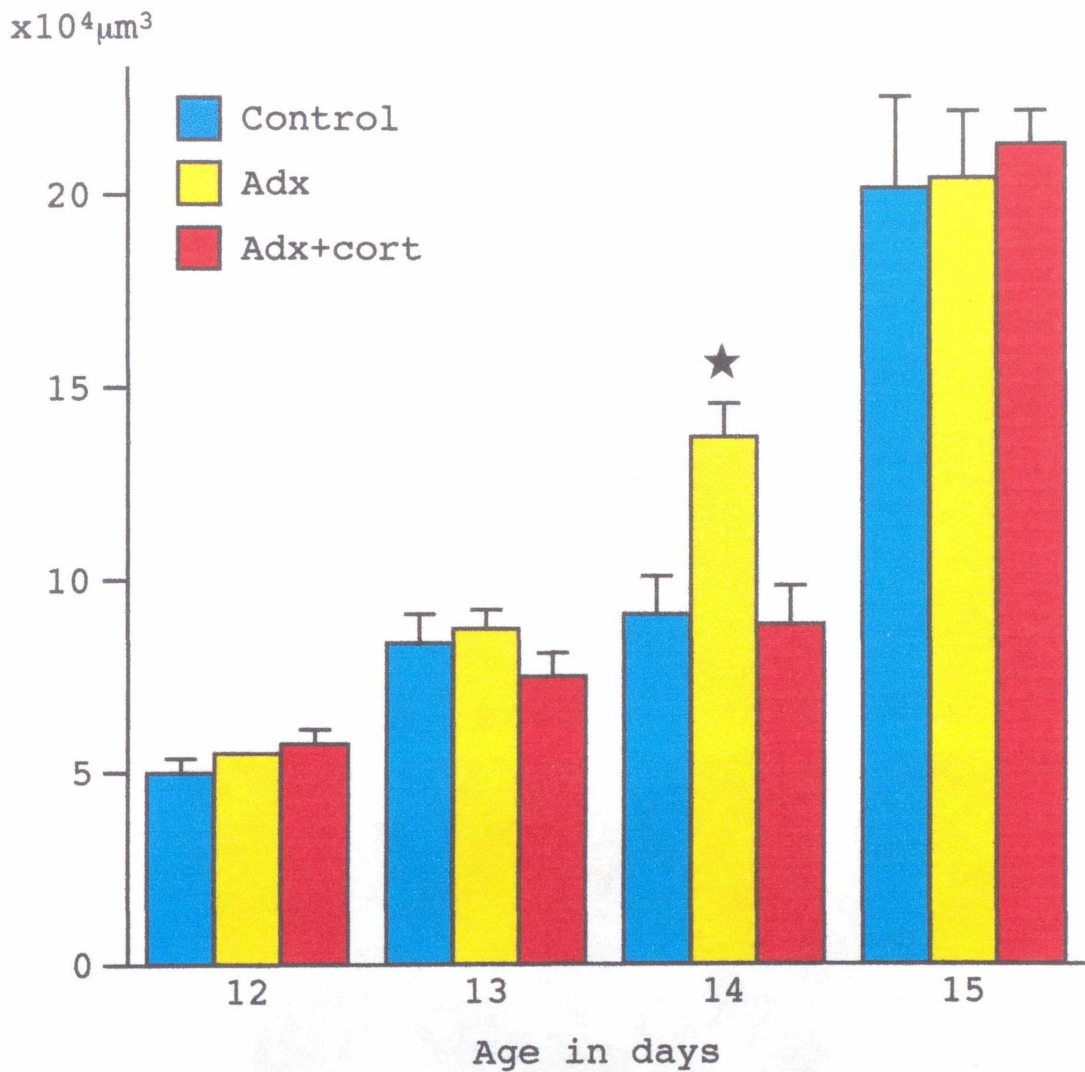


Fig. 39. Collective volume of glucagon-positive cells  
 ★ Significantly different from both the control and Adx+cort groups (  $P < 0.05$  ).

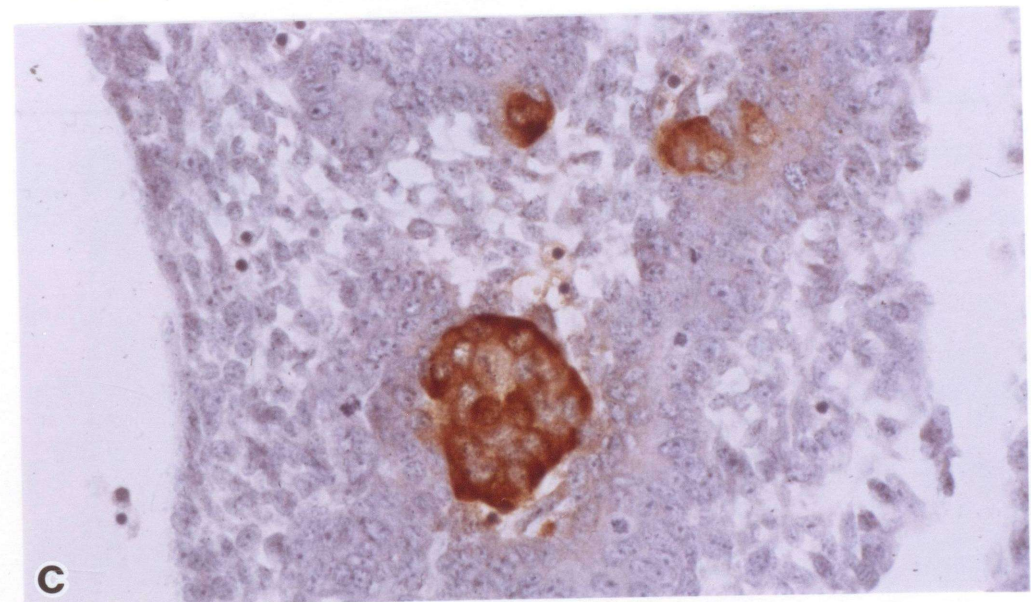
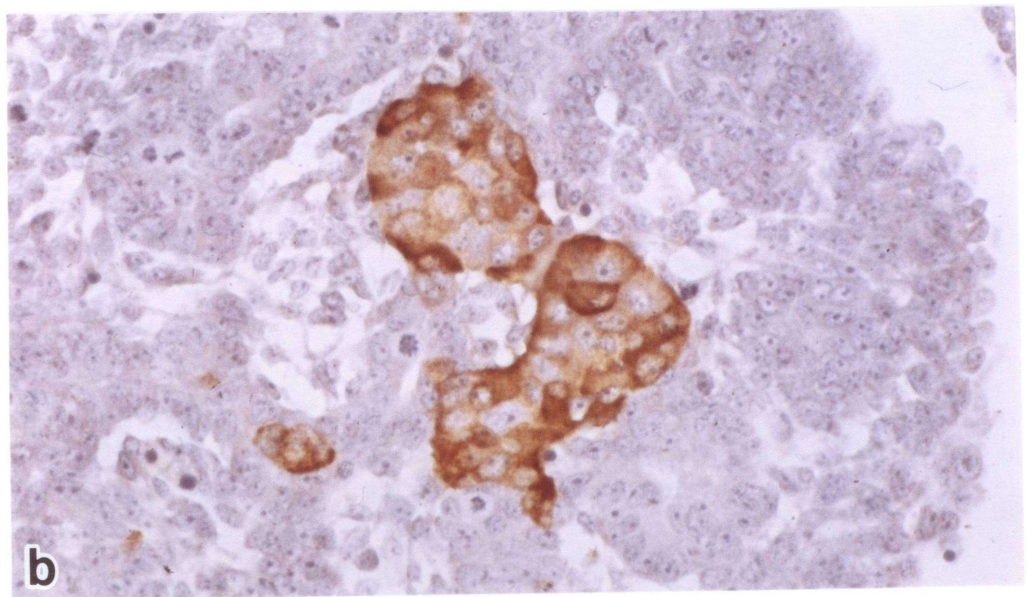
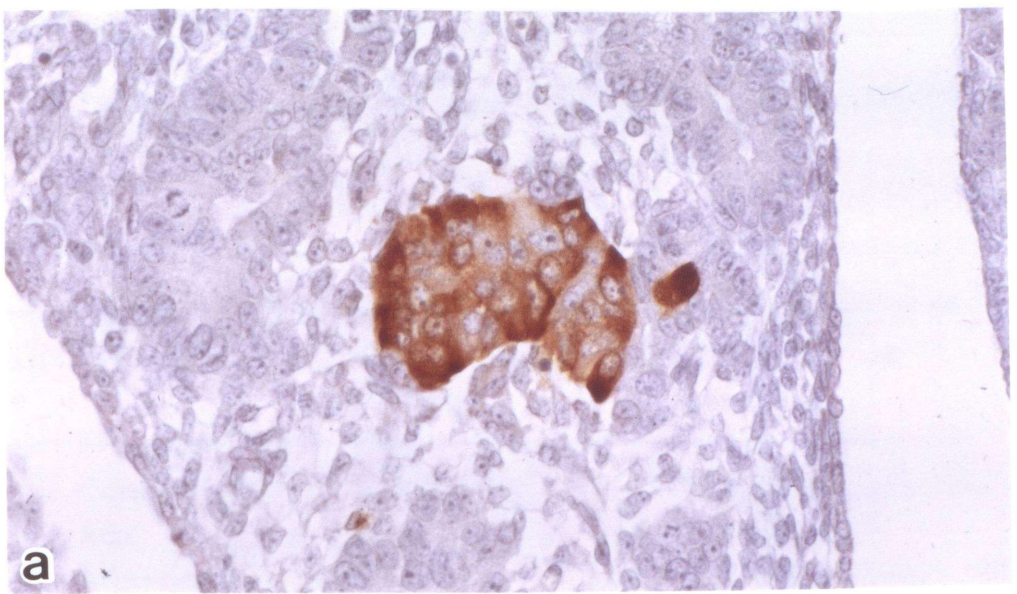


Fig. 40. 胎齡14日の膵臓原基、抗グルカゴン血清を用いた免疫染色、x470

a: コントロール群

b: Adx群

c: Adx+cort群



Table 5. Total number of somatostatin-positive cells ( mean $\pm$ S.E.M. )

Age in days	Group	No. of samples (litters)	Total number of D-cells
12	Control	7(3)	2.4 $\pm$ 0.3
	Adx	9(3)	2.4 $\pm$ 0.4
	Adx+cort	9(3)	2.6 $\pm$ 0.4
13	Control	8(3)	5.4 $\pm$ 0.6
	Adx	9(3)	4.2 $\pm$ 0.6
	Adx+cort	9(3)	4.7 $\pm$ 0.6
14	Control	9(3)	8.3 $\pm$ 0.9
	Adx	8(3)	8.9 $\pm$ 0.7
	Adx+cort	8(3)	7.5 $\pm$ 0.5
15	Control	8(3)	18.0 $\pm$ 1.7
	Adx	8(3)	21.0 $\pm$ 2.1
	Adx+cort	7(3)	15.7 $\pm$ 1.8
16	Control	8(3)	26.4 $\pm$ 2.2
	Adx	8(3)	29.5 $\pm$ 3.8
	Adx+cort	7(3)	26.0 $\pm$ 2.9

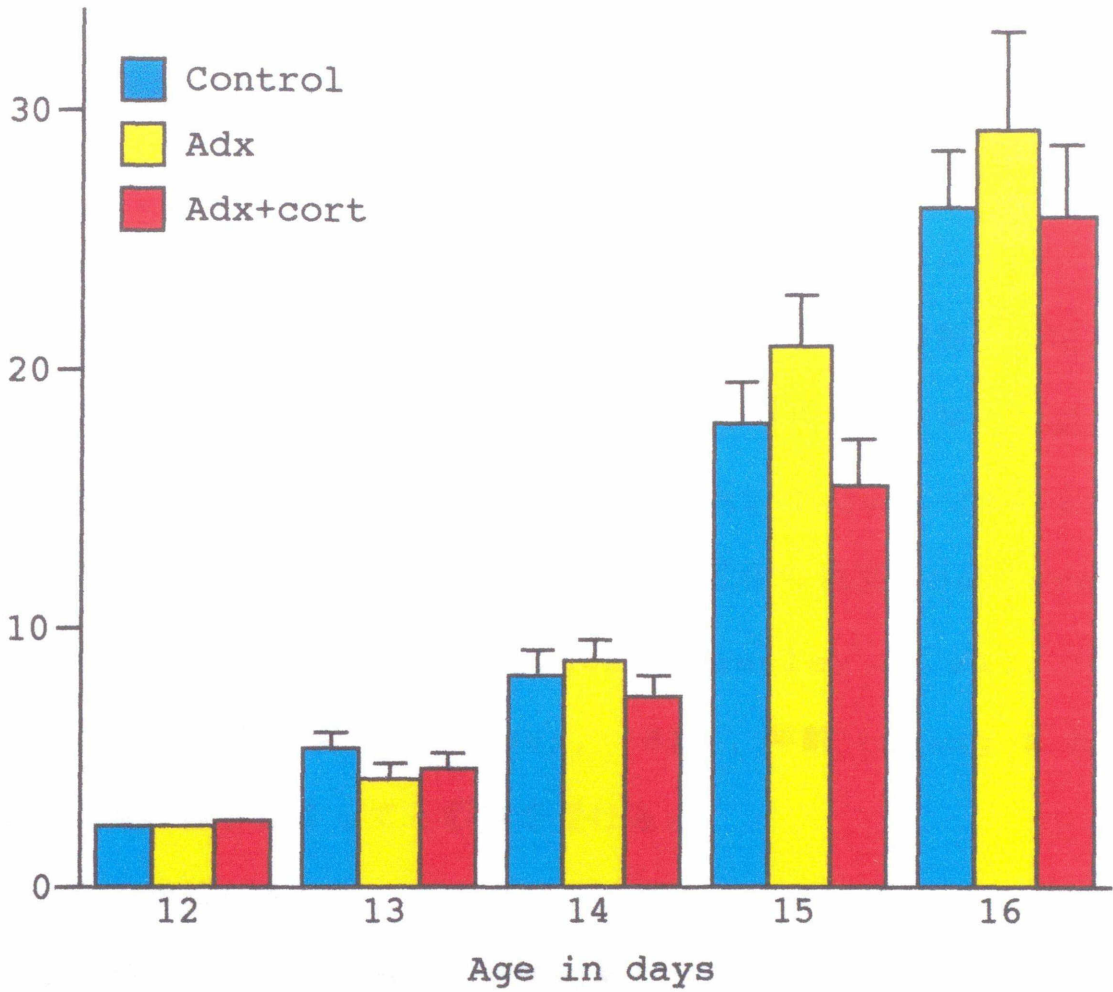


Fig. 41. Total number of somatostatin-positive cells

### 第三章 ラット胎子膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの局在

第二章において妊娠初期に母体の副腎を除去すると、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化が抑制され、その主な要因は母体の副腎皮質ホルモンの欠損であることが示唆された。一般にコルチコステロンを含むグルココルチコイドの作用は、標的細胞の特異的細胞質レセプター、すなわちグルココルチコイドレセプターと結合することによって引き起こされる (Yamamoto, '85)。ホルモン-レセプター複合体は形質転換され核内に移動した後、標的遺伝子上のグルココルチコイド応答因子に結合することによって選択的に遺伝子の発現を調節している。この調節は促進的作用である場合あるいは抑制的作用である場合の両者が存在する。グルココルチコイドの作用の程度はホルモン濃度と細胞内レセプター数の両者によって決定される (Danielsen & Stallcup, '84)。またグルココルチコイドの作用は、細胞分化の程度 (Ballard, '79)、Receptor modifying factors (Housley et al., '84)、細胞周期 (Cidlowski & Cidlowski, '82)、年齢 (Chang & Roth, '79) など、他の因子によっても影響を受ける。

成熟ラットの膵臓において、グルココルチコイドレセプター mRNA は内分泌部で最もよく発現し、次いで腺房、導管の順に発現していることが報告されている (Matthes et al., '94)。また新生子ラットの膵臓サイトゾルは特異的にデキサメタゾンと結合する能力を持つ。そして生後15~20日の血中コルチコステロンの上昇にともない、サイトゾルのデキサメタゾン結合能力が増加することが報告されている (Lu et al., '87)。しかし現在のところ、ラット胎子膵臓がグルココルチコイドレセプターを持っているかどうかについての報告はない。もし胎子膵臓にグルココルチコイドレセプターが存在するな

らば、第二章において観察された母体副腎除去による胎子インシュリン陽性細胞総体積の減少に、母体のグルココルチコイドが関与をしているという裏付けになるであろう。そこで本章では、ラット胎子膵臓にグルココルチコイドレセプターが存在するかどうかを調べることを目的とした。胎齢14日以前の胎子において、膵臓のみを取り出すことは困難である。そこで、膵臓を単独で取り出せる胎齢15日の胎子を用いて、ウエスタンブロット法によってグルココルチコイドレセプターの存在の有無を検討した。その結果、胎齢15日の膵臓がグルココルチコイドレセプターを有することが確認されたので、胎齢12～14日の胎子を用いてグルココルチコイドレセプターに対する免疫染色を行い、グルココルチコイドレセプターが胎生期の膵臓のどの部位に、いつから存在しているかについて観察した。その後、胎齢15日の膵臓グルココルチコイドレセプターが母体副腎除去による影響を受けているかどうか検討した。

## 第一節 材料および方法

### 1) 使用動物

本章で用いた動物は、第一章で用いたものと同様である。

妊娠したラットは無処置のコントロール群、妊娠6日目に母体の副腎を除去した群 (Adx群)、そして妊娠6日目に母体の副腎を除去し、剖検日までコルチステロンを40mg/kg、母体に連日皮下投与した群 (Adx+cort群) の3群に分けた。

### 2) グルココルチコイドレセプタータンパクの抽出

母体は妊娠15日に剖検した。子宮より胎子を取り出し、直ちに臍臓を取り出してプールし、タンパク抽出時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。胎子臍臓と同様に、剖検時、母体臍臓を取り出し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

胎子臍臓および母体臍臓からグルココルチコイドレセプタータンパクを抽出する方法はO'Donnell et al. ('95)の方法に従った。凍結組織は5倍量の抽出液 (20mM Tris, 1mM EDTA、10mM Sodium molybdate, 10% Glycerol, 1mM Dithiothreitol) を用いて、テフロン・ホモジナイザーで抽出した。組織抽出液は、オプティマTL超遠心器 (Beckman) によって $2^{\circ}\text{C}$ 、105,000gで45分間超遠心し、上清を集めた。上清の一部はLowrey et al. ('51)の方法にしたがいタンパク質量の定量に使用した。残りの上清は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 3) ウェスタンブロット法

試料は、泳動用調製液 (0.125M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 20%

Glycerol, 4% Sodium dodecyle sulfate, 0.005%

Bromophenol blue, 5% Mercaptoethanol) を用いて調製した。泳動用試料を作成した後、100℃で1分間熱処理した。その後、Laemmli ('70)の方法にしたがって、7.5%ポリアクリルアミドゲル (BIO・RAD) を用いて1レーンにタンパク質量100μgを電気泳動した。

ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動したタンパク質は、Towbin et al. ('79)の方法に従って、ニトロセルロース膜 (BIO・RAD) に転写した。

転写したニトロセルロース膜上のタンパク質を同定するため、抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いてイムノブロットを行った。ブロッキング血清として5%スキム・ミルク液に反応させた後、抗グルココルチコイドレセプターモノクローナル抗体 (BuGR 2 : Affinity Bioreagent, INC) と3時間反応させた。次いで二次抗体としてマウス・ビオチン化IgG (フナコシ) を1時間反応させた後、常法にしたがってABC反応 (ベクタステインABCキット、フナコシ) を行った。

### 3) 免疫組織化学的観察方法

母体は妊娠12、13、14および15日に剖検した。胎子を取り出し4%パラホルムアルデハイドで4℃、2時間固定した。固定した胎子は常法にしたがってパラプラスチック包埋し、5μmの連続切片を作成した。切片は抗グルココルチコイドレセプターポリクローナル抗体 (#57 : Affinity Bioreagent, INC) を用いて免疫染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

## 第二節 観察結果

### 1) 母体および胎子膵臓グルココルチコイドレセプターの存在

妊娠15日の母体膵臓および胎齢15日の胎子膵臓のウエスタンブロットの結果を図-42に示した。

妊娠15日の母体膵臓は、約97kDaのグルココルチコイドレセプタータンパクのバンドを示した。胎齢15日の胎子膵臓は母体膵臓と同様、グルココルチコイドレセプターを持っていたが、その量は母体膵臓と比べて微量であった。

### 2) 母体膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの分布

妊娠15日の母体膵島の免疫染色像を図-43に示した。

大部分の膵島細胞は、核内に強い抗グルココルチコイドレセプター血清に対する陽性反応を示した。膵島細胞の細胞質も、量は少ないがグルココルチコイドレセプターを持っていた。

ほとんどすべての外分泌部腺房細胞は細胞質内グルココルチコイドレセプターを有していた(図-44)。時折、腺房細胞の核内に強い陽性反応も観察された。またグルココルチコイドレセプターは導管の上皮細胞の核内にも存在した。

### 3) 胎子膵臓におけるグルココルチコイドレセプターの出現時期および分布

胎齢12日の胎子膵臓の免疫染色像を図-45に示した。

胎齢12日において、胎子膵臓はすでにグルココルチコイドレセプターを有していた。抗グルココルチコイドレセプターに対する陽性反応は、膵島原基と思われる細胞集団の核内(矢印)や管状の膵臓原基を形成している細胞の核内

(矢頭) に認められた。

胎齢13日の胎子膵臓の免疫染色像を図-46に示した。

胎齢13日において、グルココルチコイドレセプターは主に膵島細胞の核内に見られた(矢印)。免疫反応は胎齢12日に比べると強くなっていた。外分泌細胞の核内において、時折グルココルチコイドレセプターが認められたが、その免疫反応は膵島原基におけるものよりもかなり弱かった(矢頭)。

胎齢14日の胎子膵臓の免疫染色像を図-47に示した。

この胎齢において、膵臓内グルココルチコイドレセプターの分布は胎齢13日と同じであった。強いグルココルチコイドレセプター陽性反応は、発達して大きくなってきた膵島原基の大部分の膵島細胞の核内(矢印)や、分泌管から出芽中の内分泌細胞の核内(矢頭)などに認められた。

4) 母体副腎除去が母体膵臓グルココルチコイドレセプターの含有量および分布に及ぼす影響

妊娠15日のコントロール群、Adx群、Adx+cort群の母体膵臓のウエスタンブロット法の結果を図-48に示した。

Adx群の母体グルココルチコイドレセプターは、コントロール群に比べて減少していたが、Adx+cort群のグルココルチコイドレセプターはコントロール群と同程度認められた。

妊娠15日のコントロール群、Adx群、Adx+cort群の母体膵臓の免疫染色像を図-49、50に示した。



Adx群の膵島において、抗グルココルチコイドレセプター抗体に対する陽性反応はコントロール群と同様であった(図-49)。しかし腺房においては、副腎除去すると核内にグルココルチコイドレセプターを持つ腺房細胞が、コントロール群と比べて減少していた(図-50)。

Adx+cort群の抗グルココルチコイドレセプター抗体に対する陽性反応は、コントロール群と同様、ほとんどの膵島細胞および一部の腺房細胞の核内に認められた(図-49)。膵島細胞と腺房細胞の細胞質の反応性も、コントロール群が示すものと同程度であった(図-50)。

#### 5) 母体副腎除去が胎子膵臓グルココルチコイドレセプターの含有量および分布に及ぼす影響

胎齢15日のコントロール群、Adx群、Adx+cort群の胎子膵臓のウエスタンブロットの結果を図-51に示した。

Adx群の胎子膵臓のグルココルチコイドレセプターは、Adx群の母体膵臓のウエスタンブロットの結果とは異なり、コントロール群と差は認められなかった。また、Adx+cort群のグルココルチコイドレセプター量はコントロール群、Adx群と比べて差は認められなかった。

胎齢15日のコントロール群、Adx群、Adx+cort群の胎子膵臓の免疫染色像を図-52に示した。

コントロール群の胎子は、発達した膵島原基内において、大部分の膵島細胞の核内に強いグルココルチコイドレセプター陽性反応を示した。同様の陽性反応は、一部の分泌管上皮細胞においても観察された。外分泌細胞の核内にはグルココルチコイドレセプターは時折認められるにすぎず、またその免疫反応は

藤島細胞の反応に比べて非常に弱かった。

この胎齢において、母体の副腎除去、あるいは母体副腎除去およびコルチコステロン投与は、胎子腺臓グルココルチコイドレセプターの局在性および染色強度に対して変化を与えなかった。

### 第三節 考察

本章の実験において、グルココルチコイドレセプターに対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、胎齢15日の胎子膵臓は約97kDaの部位にレセプターに陽性なタンパクを有しており、グルココルチコイドレセプターを持っていることが証明された。またポリクローナル抗体を用いた免疫染色は、母体および胎子の膵島細胞の核内に強い陽性反応を示した。本章の実験で用いた2種類の抗体のグルココルチコイドレセプターに対する特異性はこれまでの報告で十分に証明されているので（マウス唾液腺：

Jaskoll et al., '94 ; ラット肝臓：Gametchu & Harrison, '84 ; L-929線維芽細胞およびGH<sub>3</sub>下垂体腫瘍細胞：LaFond et al., '88 ; ラット蝸牛：ten Cate et al., '93 ; HeLa S3細胞およびCHO細胞：Cidlowski et al., '90 ; ラット海馬：O'Donnell et al., '95）、本章で観察された免疫染色の結果から、ラット胎子膵臓は胎齢12日においてすでにグルココルチコイドレセプターを有していることが証明された。

妊娠6日目に母体の副腎を除去した時、妊娠15日の母体膵臓グルココルチコイドレセプター量はコントロール群に比べ相対的に減少していた。またレセプターの抗体に対する反応性がコントロール群と比べて膵島細胞は変化しなかったのに対し、腺房細胞は陽性を示す細胞数が減少していた。したがって膵臓のレセプター量が減少したのは、膵島に存在するグルココルチコイドレセプターの減少というよりは、腺房に存在するグルココルチコイドレセプターの減少によるものであると考えられる。また副腎除去したラットにコルチコステロンを投与すると、母体膵臓が持つグルココルチコイドレセプター量の減少は阻止さ

れた。副腎除去による組織内グルココルチコイドレセプター量の変化は、種々の組織において研究されている。成熟ラット精巣内グルココルチコイドレセプター免疫活性は、副腎除去5日後において減少する (Biagini et al., '95)。逆に副腎除去が、成熟ラット肝臓 (Gregory et al., '76) および成熟ラット海馬 (O'Donnel et al., '95) の組織グルココルチコイドレセプター量を増加させることもある。Kalinyak et al. ('87) は、副腎除去して14日後に、あるいはデキサメタゾン投与6時間後にグルココルチコイドレセプターcRNAプローブを用いて種々のラット組織におけるグルココルチコイドレセプターmRNA量の変化を測定し、組織内グルココルチコイドレセプターmRNAは、グルココルチコイドによって組織特異的なオートレギュレーション (アップレギュレーションあるいはダウンレギュレーション) を受けていると報告した。これらの実験はすべて妊娠していない成熟ラットを用いているが、本章の結果と併せて考えると、妊娠ラットの膵臓において、内因性グルココルチコイドは膵島および腺房それぞれに存在するグルココルチコイドレセプターに対して異なる調節機構を有している可能性が考えられる。すなわち、Adx群の母体ラットにおいて、腺房では内因性グルココルチコイドが欠乏すると、グルココルチコイドレセプターmRNA合成が抑制され、その結果、グルココルチコイドレセプター量が減少したことが示唆される。成熟ラットの膵島グルココルチコイドレセプター量は副腎除去後14日で減少するという報告がある (Fischer et al., '90)。本章では母体副腎除去は妊娠6日に行い、9日後の妊娠15日の膵臓のグルココルチコイドレセプターについて検討しているので、副腎除去による影響がまだ発現しないか、あるいは影響が弱いため、副腎除去による変化が膵島細胞の免疫反応に反映されなかったのかもしれない。

ウエスタンブロット法の結果から、副腎除去が母体膵臓のグルココルチコイ

ドレセプター量を減少させたのとは対照的に、胎齢15日の胎子膵臓グルココルチコイドレセプター量は母体副腎除去の影響を受けなかった。生後10日のラットを副腎除去すると、グルココルチコイドの欠乏が膵臓サイトゾル中のグルココルチコイドレセプターのデキサメタゾンとの結合能力に対してアップレギュレーションすることが、術後3日後から確かめられている (Yoon & Lee, '92) ので、生後10日以降の膵臓は、グルココルチコイドによるグルココルチコイドレセプターのオートレギュレーションが働いていると考えられる。また周生期の肝臓と脳におけるグルココルチコイドレセプターに対するグルココルチコイドのオートレギュレーションを研究した論文 (Kalinyak et al., '89) によると、デキサメタゾンの単回投与が組織内グルココルチコイドレセプター-mRNAの変化を引き起こすのは、肝臓では生後1週間以降、脳では生後2週間以降であるという。しかし胎齢16日の脳 (Meaney et al., '85) または胎齢19日の肝臓 (Feldman, '74) サイトゾルのレセプターはデキサメタゾンと結合することができる。したがって、胎子組織に存在するグルココルチコイドレセプターがグルココルチコイドと結合する能力を持つ、つまり機能し始める時期は一樣ではなく、さらにグルココルチコイドによるレセプターの調節機構が機能し始める時期も異なっていると考えられる。第二章において観察された母体副腎除去が胎子インシュリン陽性細胞を減少させる主な原因は、グルココルチコイドの欠損であることが示唆された。また本章においては、ラット胎子膵臓には、胎齢12日にはグルココルチコイドレセプターが存在することが証明された。さらに母体の副腎除去は胎齢15日の膵臓に含まれるレセプター量を変化させなかった。したがって本研究において検討した胎齢12~15日に胎子膵臓はグルココルチコイドに対するレセプターを持っているが、グルココルチコイドによるオートレギュレーションは受けていないようである。本章

においては胎子膵臓サイトゾルのリガンド結合アッセイは行っていないので、胎齢12～15日の間、膵臓に認められたグルココルチコイドレセプターがグルココルチコイドと結合してその作用を発揮することができるかどうかは分からないが、胎齢11日あるいは12日という早期に母体由来のコルチコステロンが欠乏したため、レセプターを介しての種々の反応が進行せず、インシュリン陽性細胞の増殖および/あるいは分化が遅れたという推論は捨てがたい。

#### 第四節 小括

胎齡15日の胎子腭臓がグルココルチコイドレセプターを有するかどうかを調べる目的でウエスタンブロット法を行った。その結果、胎齡15日の胎子腭臓は、微量ではあるが約97kDaのグルココルチコイドレセプターを持っていることがあきらかとなったので、引き続き胎子腭臓がいつから、腭臓のどの部位にグルココルチコイドレセプターを持っているのかを免疫組織化学的に検討した。ラット胎子腭臓は、胎齡12日にすでにグルココルチコイドレセプターを持っていた。グルココルチコイドレセプターは主に腭島細胞の核内に存在した。次いで胎子腭臓のグルココルチコイドレセプター量は母体の副腎除去の影響を受けるかどうかを調べるため、胎齡15日の胎子腭臓ならびに母体の腭臓を用いてウエスタンブロット法および免疫染色を行った。妊娠6日目に副腎を除去した母体の腭臓のグルココルチコイドレセプター量は、コントロール群に比べて減少していた。この減少はコルチコステロンを投与することにより阻止された。しかし胎齡15日の胎子腭臓のグルココルチコイドレセプター量はコントロール群と差は見られなかった。これらの所見から、ラット胎子腭臓は胎齡12日にすでにグルココルチコイドに対するレセプターを有していることが証明されたので、胎子腭臓の発達には母体由来のグルココルチコイドが関与している可能性が示唆された。

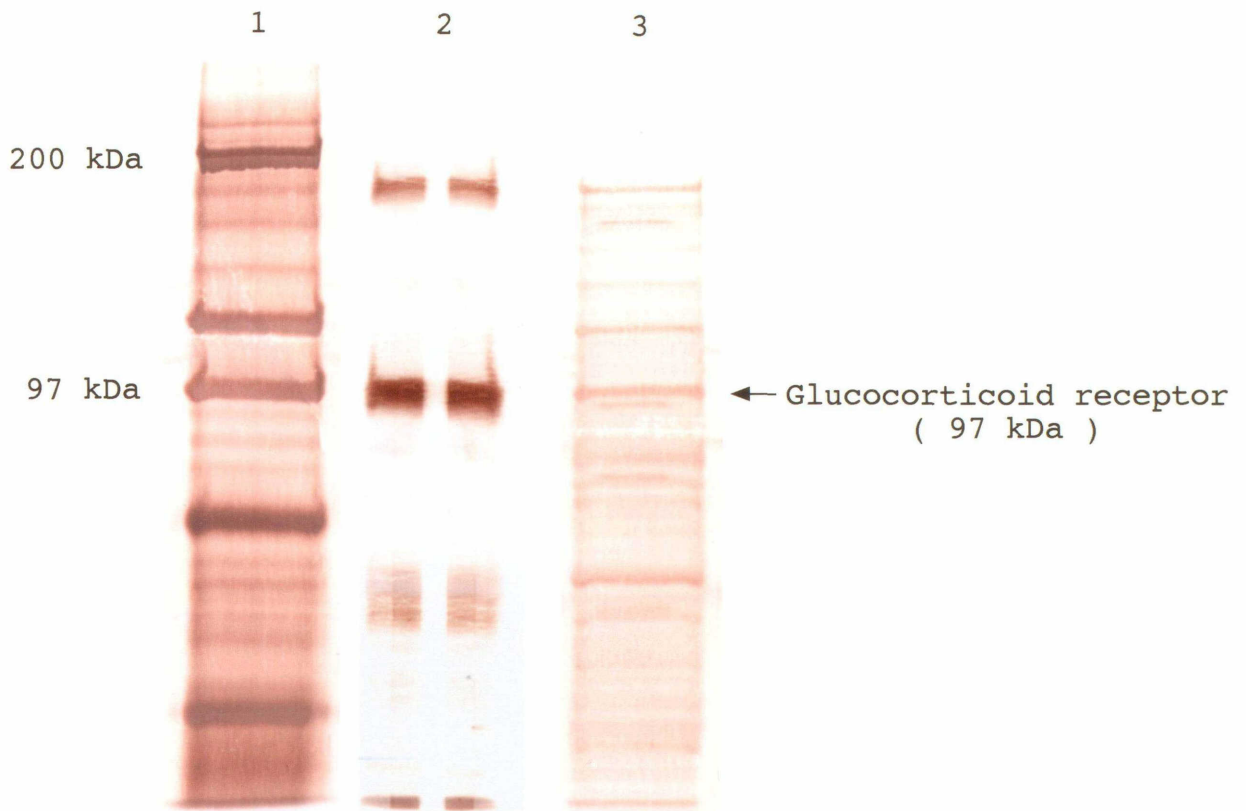


Fig. 42. Western blot analysis of the glucocorticoid receptor using maternal and fetal pancreatic extracts on day 15 of gestation.

- Lane 1, Standard protein.
- Lane 2, Maternal pancreas.
- Lane 3, Fetal pancreas.



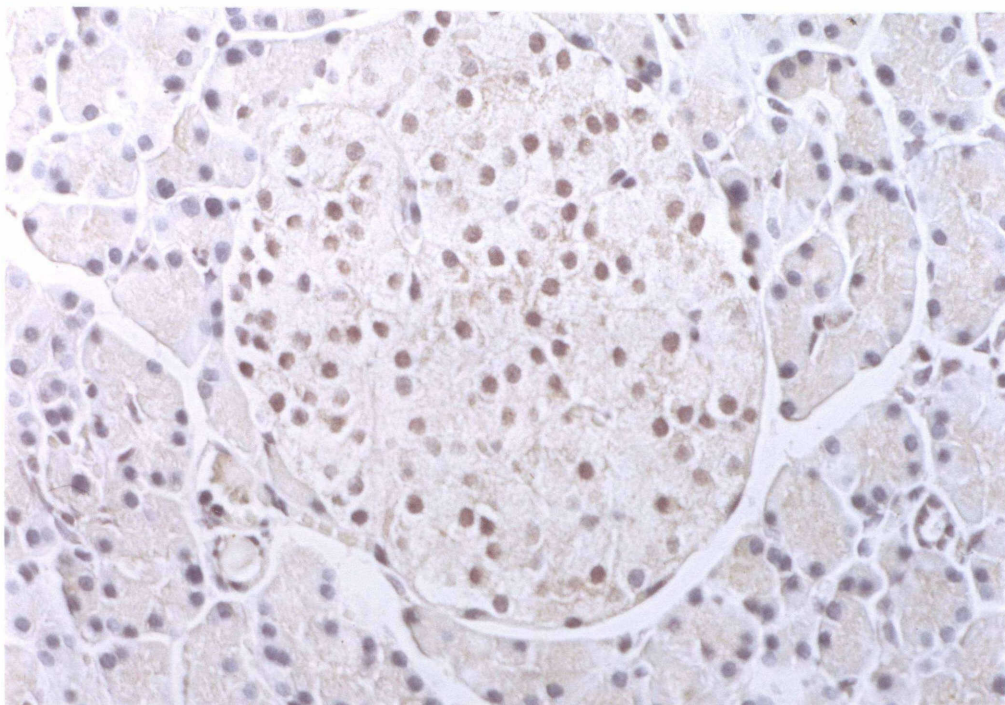


Fig. 43. 妊娠15日の母体膵島  
抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x470

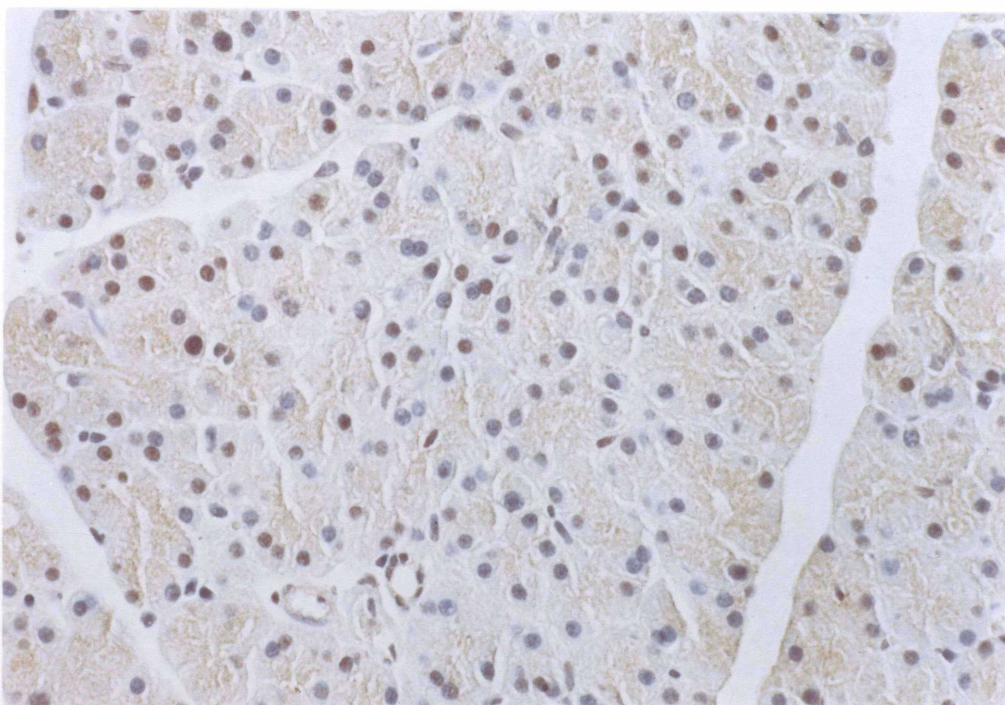


Fig. 44. 妊娠15日の母体の膵臓外分泌部  
抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x470

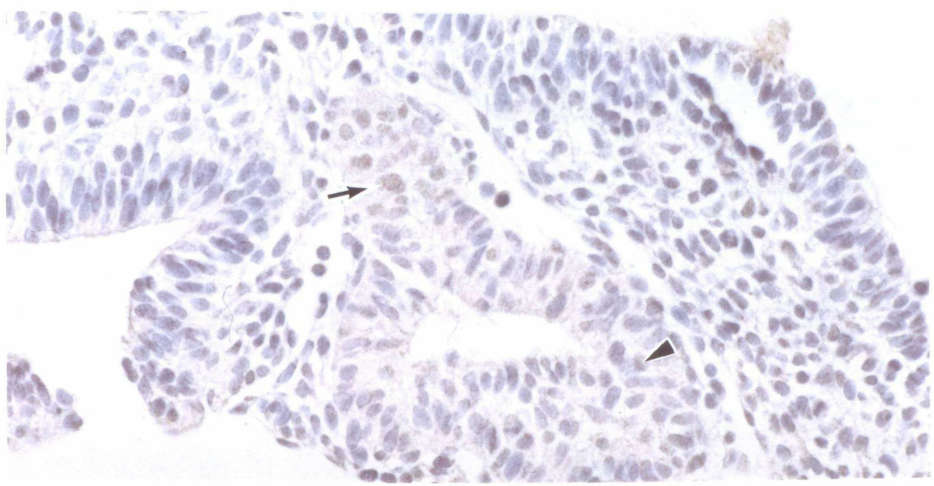


Fig. 45. 胎齡12日の膵臓原基  
 抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x385  
 矢印：膵島原基と思われる細胞集団の核内の陽性反応  
 矢頭：膵臓原基を形成している細胞の核内の陽性反応

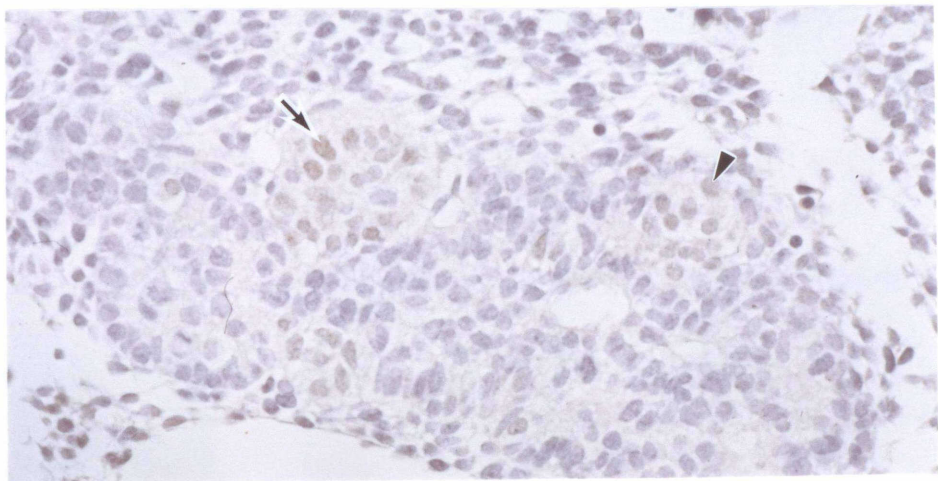


Fig. 46. 胎齡13日の膵臓原基  
 抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x385  
 矢印：膵島細胞の核内の陽性反応  
 矢頭：外分泌細胞の核内の陽性反応

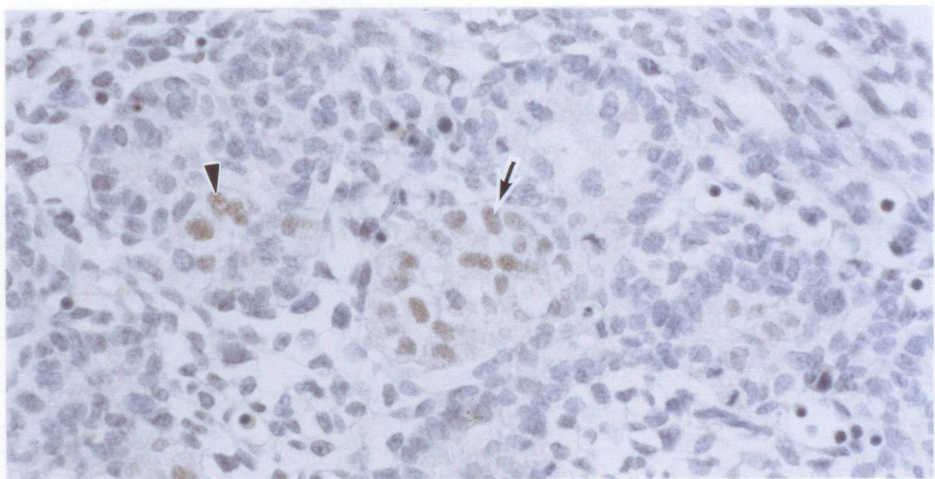


Fig. 47. 胎齡14日の膵臓原基  
 抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x385  
 矢印：膵島細胞の核内の陽性反応  
 矢頭：分泌管から出芽中の内分泌細胞の核内の陽性反応

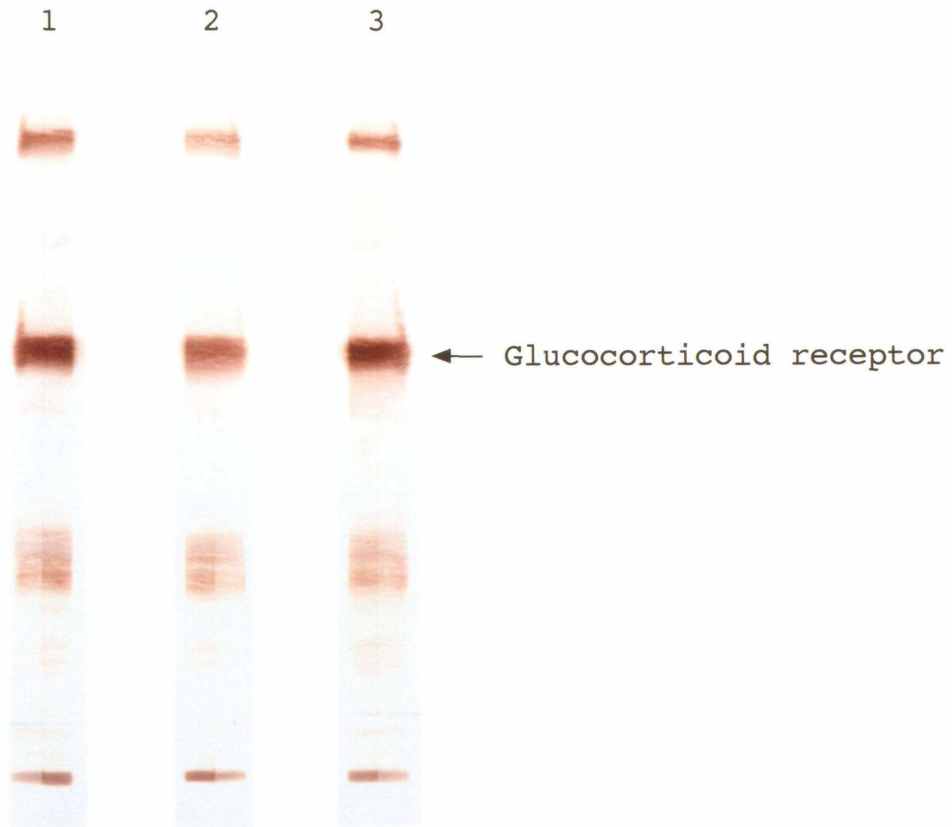


Fig. 48. Western blot analysis of the glucocorticoid receptor using maternal pancreatic extracts on day 15 of gestation.

- Lane 1, Control group.
- Lane 2, Adx group.
- Lane 3, Adx+cort group.

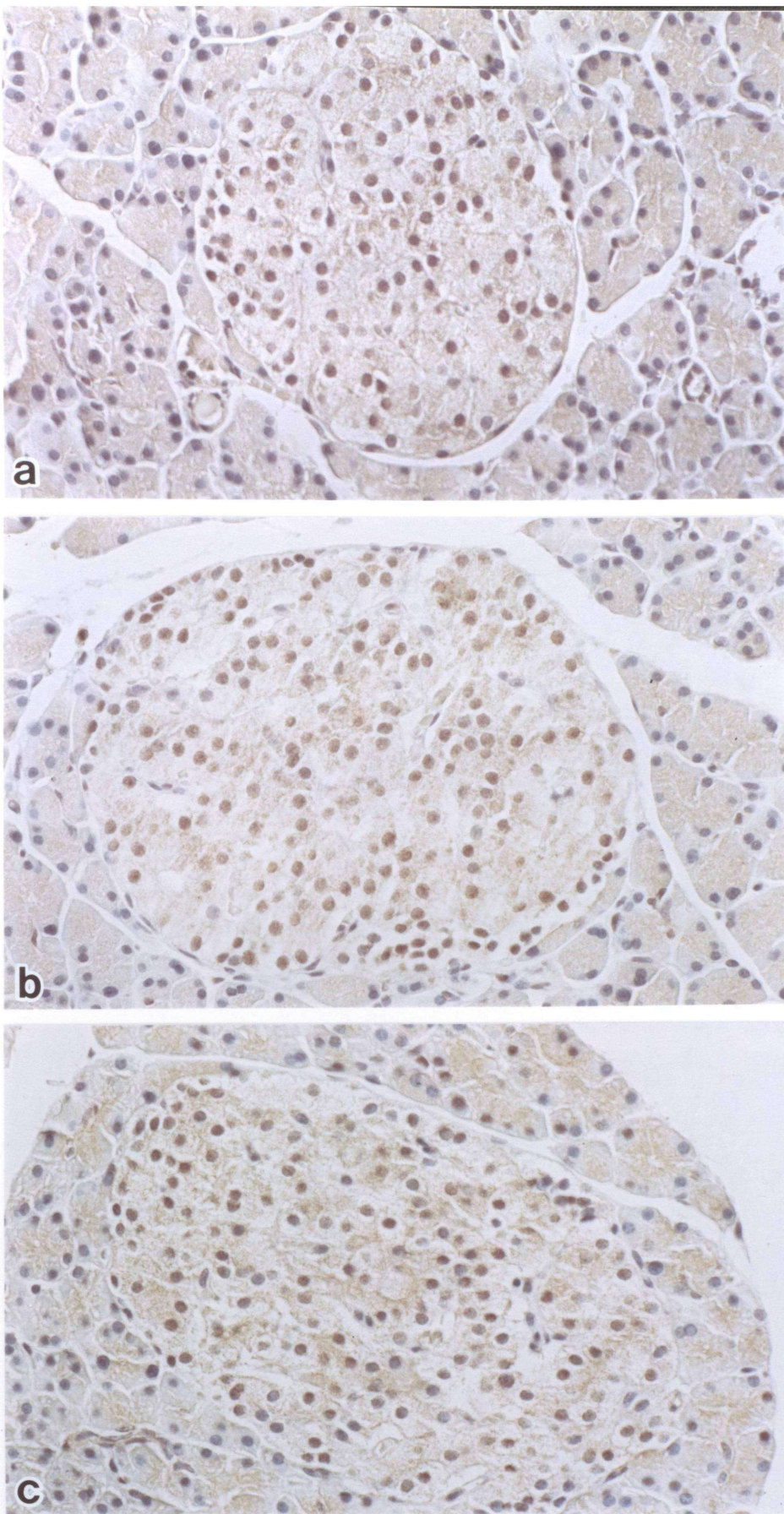


Fig. 49. 妊娠15日の母体臍島  
抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x385  
a: コントロール群  
b: Adx群  
c: Adx+cort群

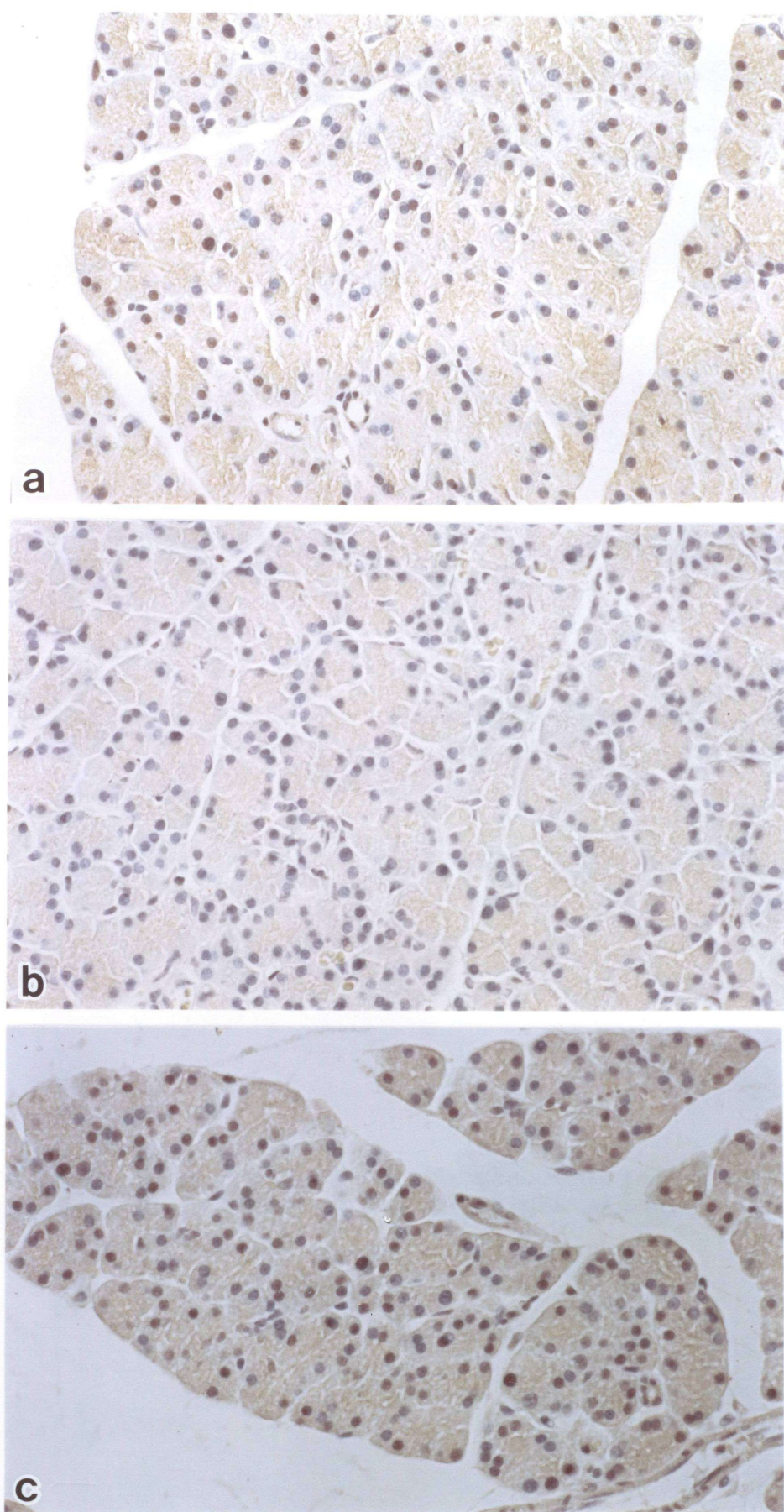


Fig. 50. 妊娠15日の母体の臍臓外分泌部  
抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x385

- a : コントロール群
- b : Adx群
- c : Adx+cort群

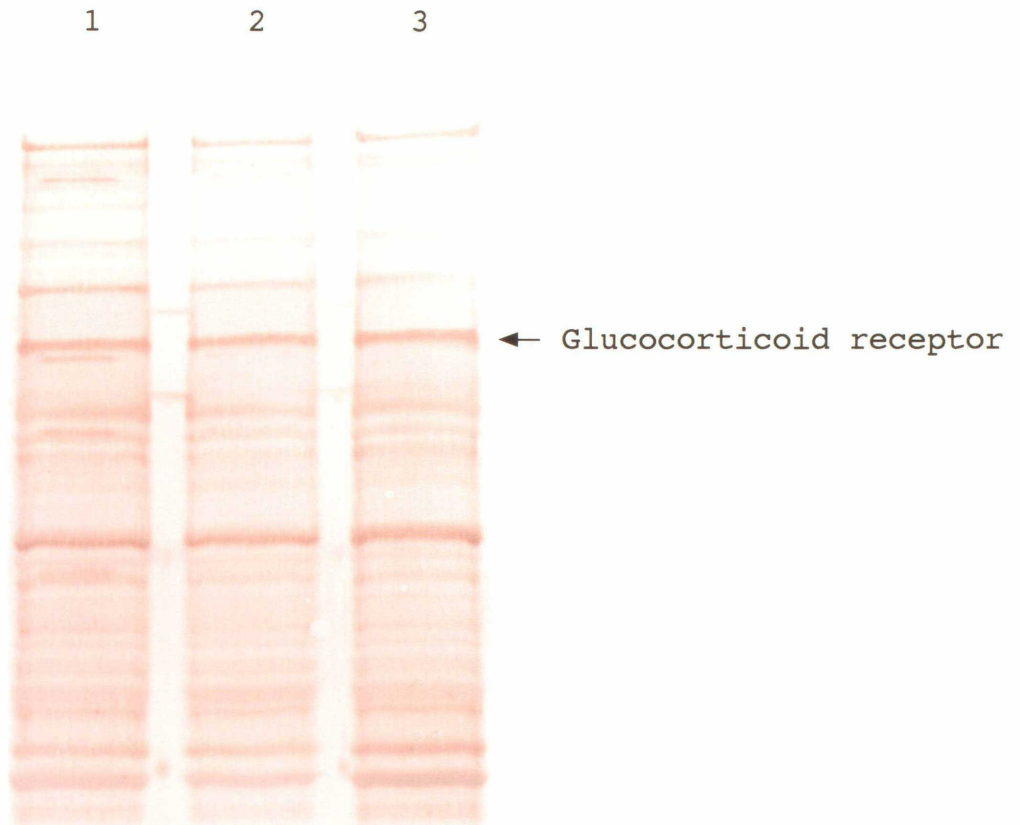


Fig. 51. Western blot analysis of the glucocorticoid receptor using fetal pancreatic extracts on day 15 of gestation.

Lane 1, Control group.  
Lane 2, Adx group.  
Lane 3, Adx+cort group.

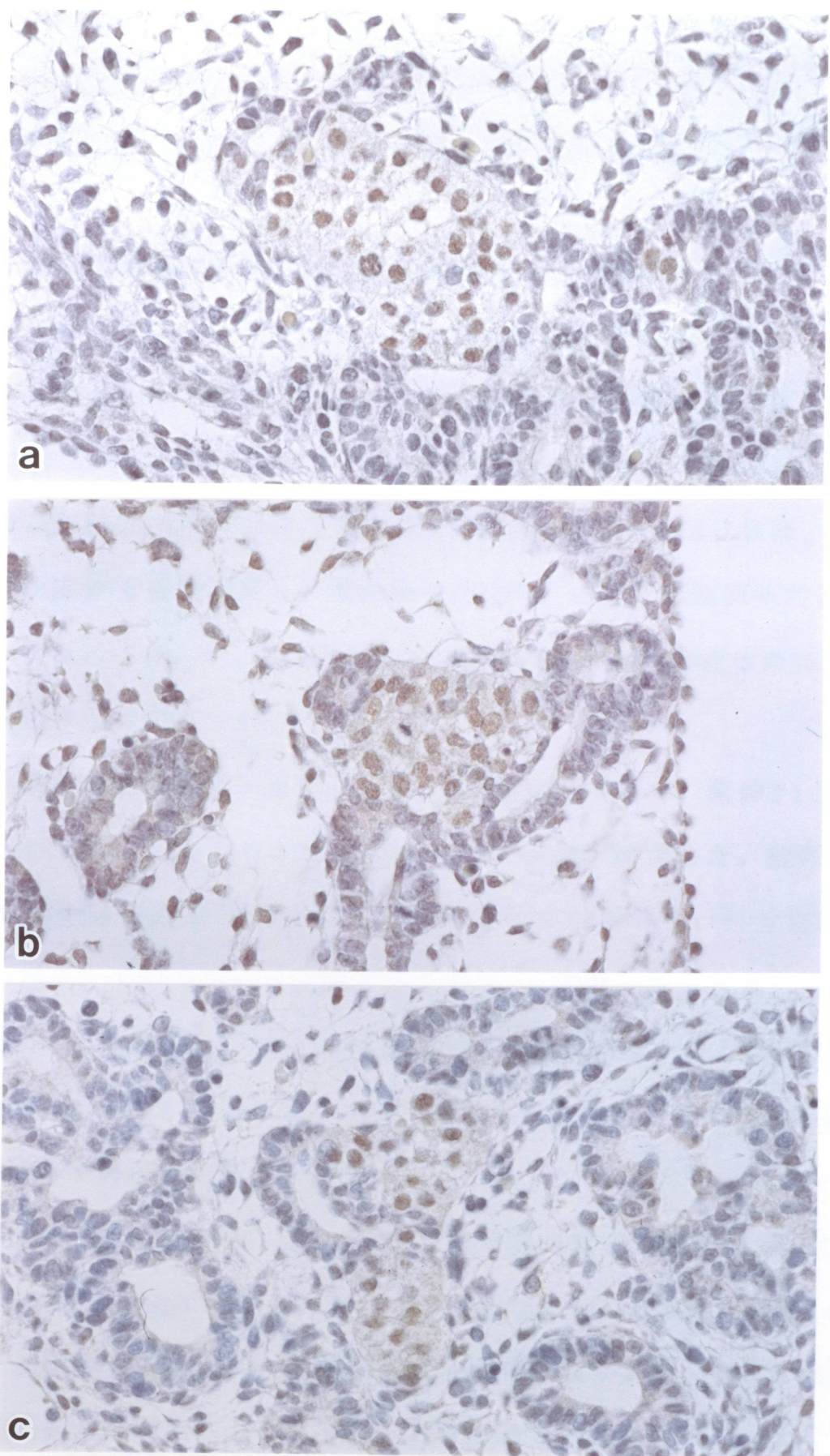


Fig. 52. 胎齡15日の膵臓原基  
抗グルココルチコイドレセプター抗体を用いた免疫染色、x470  
a: コントロール群  
b: Adx群  
c: Adx+cort群

## 総括

1) ラット胎子膵島細胞の分化を光学顕微鏡的、免疫組織化学的および電子顕微鏡的に観察した。ラット胎子において膵臓原基は胎齢11日から12日の間に前腸から膨出して形成される。胎齢12日では膵島原基と思われる構造が確認され、胎齢13日になると膵島原基が膵臓外分泌部と明らかに区別された。膵島原基の数は胎齢15日まではあまり増えなかったが、胎齢16日以降、外分泌部の分泌管上皮から多数の新しい膵島原基が出芽し始め、膵島原基の数は劇的に増加し、大きさも増した。胎齢20日になると一部の膵島は成体の膵島と同様の形態を示すようになった。

免疫組織化学的に胎子膵臓を観察すると、A細胞が最も早く、胎齢11日に検出された。そして胎齢12日になるとB細胞およびD細胞が出現した。胎齢13～16日の間、膵島細胞の大部分はA細胞であった。胎齢14日以降、外分泌部の分泌管の数は増え、それに伴い分泌管上皮細胞からB細胞が新生され、B細胞の数は激増した。胎齢18日になると膵島細胞のうち、B細胞が最も多くなり、膵島内の局在性はB細胞が膵島の中心を占めるようになった。そしてA細胞およびD細胞が膵島の周辺に位置していた。

電子顕微鏡的観察により胎齢13日では各膵島細胞の同定は困難であったが、胎齢14日になると、同定できる膵島細胞の数は少ないが、B細胞とA細胞の同定ができた。胎齢が進むにつれ、各膵島細胞は顆粒の数が増え、胎齢21日になると、成体の膵島で見られるような特徴的な形態を示すようになった。

2) 妊娠6日に母体の副腎を除去し、胎齢12～16日の胎子膵島の発達を免疫組織化学的に観察し、各膵島細胞の体積を計測あるいは細胞数をカウントし



た。母体の副腎を除去すると胎齢12~15日の胎子膵島インシュリン陽性細胞の総体積は減少した。この減少は副腎を除去した母体へコルチコステロンを連日投与することにより阻止された。グルカゴン陽性細胞に対しては、母体の副腎除去は胎齢14日のみ、胎子膵島グルカゴン陽性細胞の総体積を増加させた。ソマトスタチン陽性細胞総数は母体の副腎除去による影響を受けなかった。これらの所見は、妊娠初期の母体の副腎除去は、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化を抑制し、その主な要因は母体由来の副腎皮質ホルモンの欠損であることを示唆している。また母体の副腎除去はインシュリン陽性細胞に対する影響とは異なり、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の分化には関与しないと思われる。

3) 胎齢15日の胎子膵臓がグルココルチコイドレセプターを有するかどうかを調べる目的でウエスタンブロット法を行った。その結果、胎齢15日の胎子膵臓は、微量ではあるが約97kDaのグルココルチコイドレセプターを持っていることがあきらかとなったので、引き続き胎子膵臓がいつから、膵臓のどの部位にグルココルチコイドレセプターを持っているのかを免疫組織化学的に検討した。ラット胎子膵臓は、胎齢12日にすでにグルココルチコイドレセプターを持っていた。グルココルチコイドレセプターは主に膵島細胞の核内に存在した。次いで胎子膵臓のグルココルチコイドレセプター量は母体の副腎除去の影響を受けるかどうかを調べるため、胎齢15日の胎子膵臓ならびに母体の膵臓を用いてウエスタンブロット法および免疫染色を行った。妊娠6日目に副腎を除去した母体の膵臓のグルココルチコイドレセプター量は、コントロール群に比べて減少していた。この減少はコルチコステロンを投与することにより阻止された。しかし胎齢15日の胎子膵臓のグルココルチコイドレセプター量

はコントロール群と差は見られなかった。これらの所見から、ラット胎子膵臓は胎齢12日にすでにグルココルチコイドに対するレセプターを有していることが証明されたので、胎子膵臓の発達には母体由来のグルココルチコイドが関与している可能性が示唆された。

これらのことから以下の結論が得られた。1) ラット胎子膵臓において、免疫組織化学的にA細胞が胎齢11日に、B細胞およびD細胞が胎齢12日に初めて出現した。2) 母体の副腎皮質ホルモンは、胎子膵島インシュリン陽性細胞の初期分化を維持し、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞の分化には関与しない。3) ラット胎子膵臓は胎齢12日にグルココルチコイドレセプターを持っており、胎子膵臓の発達には母体由来のグルココルチコイドが関与している可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究は麻布大学獣医学部解剖学第二講座教授江口保暢博士の御鞭撻と御指導ならびに御校閲の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、絶えざる御指導を賜りました解剖学第二講座教授有嶋和義博士、そして最後まで懇切丁寧に御指導を賜りました解剖学第二講座助教授山本雅子博士に哀心から感謝致します。

また論文のとりまとめに関して御校閲と貴重な御助言を賜りました麻布大学実験動物学講座教授二宮博義博士に対して哀心より深謝致します。

さらに解剖学第二講座の先輩でもあり、論文作成にあたり適切な御助言ならびに御支援賜りました動物工学講座助教授滝沢達也博士、薬理学講座助教授白井明志博士に心より感謝致します。

最後に本研究の遂行にあたって多大の御協力と御支援をいただきました麻布大学解剖学第二講座の教室員の皆様に心から謝意を表します。

## References

1. Ballard, P.L. and Ballard, R.A. (1972)  
Glucocorticoid receptors and the role of glucocorticoids in fetal lung development.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69:2668-2672.
2. Ballard, P.L. (1979)  
Glucocorticoid hormone action. In: Baxter, J.D. and Roussear, G.G. (eds): Monographs in Endocrinology. Vol. 12. Springer-Verlag, Berlin, pp 493-497.
3. Biagini, G., Merlo Pich, E., Frasoldati, A., Agnati, L.F. and Marrama, P. (1995)  
Changes in glucocorticoid receptor immunoreactivity after adrenalectomy and corticosterone treatment in the rat testis.  
J. Endocrinol. Invest., 18:384-390.
4. Bonner-Weir, S. and Orci, L. (1982)  
New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat.  
Diabetes, 31:883-889.
5. Chang, W.C. and Roth, G.S. (1979)  
Changes in the mechanisms of steroid action during aging.  
J. Steroid Biochem., 11:889-892.
6. Cidlowski, J.A. and Cidlowski, N.B. (1982)  
Glucocorticoid receptors and the cell cycle: evidence that the accumulation of glucocorticoid receptors during the S phase of the cell cycle is dependent on ribonucleic acid and protein synthesis.  
Endocrinology, 110:1653-1662.

7. Cidlowski, J.A., Bellingham, D.L., Powell-Oliver, F.E., Lubahn, D.B. and Sar, M. (1990)  
Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmic and nuclear receptors.  
*Mol. Endocrinol.*, 4:1427-1437.
8. Clark, W.R. and Rutter, W.J. (1972)  
Synthesis and accumulation of insulin in the fetal rat pancreas.  
*Dev. Biol.*, 29:168-181.
9. Cohen, A. (1973)  
Plasma corticosterone concentration in the foetal rat.  
*Horm. Metab. Res.*, 5:66.
10. Danielsen, M. and Stallcup, M.D. (1984)  
Down-regulation of glucocorticoid receptors in mouse lymphoma cell variants.  
*Mol. Cell Biol.*, 4:449-453.
11. Dupouy, J.P., Coffigny, H. and Magre, S. (1975)  
Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats.  
*J. Endocrinol.*, 65:347-352.
12. Eisen, H.J., Goldfine, I.D. and Glinsmann, W.H. (1973)  
Regulation of hepatic glycogen synthesis during fetal development: roles of hydrocortisone, insulin and insulin receptors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:3454-3457.
13. Feldman, D. (1974)  
Ontogeny of rat hepatic glucocorticoid receptors.  
*Endocrinology*, 95:1219-1227.

14. Fischer, B., Rausch, U., Wollny, P., Westphal, H., Seitz, J. and Aumüller, G. (1990)  
Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic  $\beta$ -cells of the rat.  
*Endocrinology*, 126:2635-2641.
15. Fontaine, J. and Le Douarin, N.M. (1977)  
Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras: the problem of the neurectodermal origin of the cells of the APUD series.  
*J. Embryol. Exp. Morphol.*, 41:209-222.
16. Fontaine, J., LeLièvre, C. and Le Douarin, N.M. (1977)  
What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo?  
*Gen. Comp. Endocrinol.*, 33:394-404.
17. Fujii, S. (1979)  
Development of pancreatic endocrine cells in the rat fetus.  
*Arch. Histol. Jap.*, 42:467-479.
18. Gametchu, B. and Harrison, R.W. (1984)  
Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor.  
*Endocrinology*, 114:274-279.
19. Gregory, M.C., Duval, D. and Meyer, P. (1976)  
Changes in cardiac and hepatic glucocorticoid receptors after adrenalectomy.  
*Clin. Sci. Mol. Med.*, 51:487-493.
20. Hard, W.L. (1944)  
The origin and differentiation of the alpha and beta cells in the pancreatic islets of the rat.  
*Am. J. Anat.*, 75:369-403.

21. Hellman, B. (1959)  
The effect of aging on the number of the islets of Langerhans in the rat.  
Acta Endocrinol., 32:78-91.
22. Housley, P.R., Grippo, J.F., Dahmer, M.K. and Pratt, W.B. (1984)  
In: Litwack, G. (ed): Biochemical actions of hormones. Vol. 11. pp 347-356.
23. Jones, R.E. and Moscona, A.A. (1974)  
Effects of cytosine arabinoside on differential gene expression in embryonic neural retina. I. Accumulation of glutamine synthetase with suppression of macromolecular synthesis.  
J. Cell. Biol., 61:688-700.
24. Kalinyak, J.E., Dorin, R.I., Hoffman, A.R. and Perlman, A.J. (1987)  
Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone.  
J. Biol. Chem., 262:10441-10444.
25. Kalinyak, J.E., Griffin, C.A., Hamilton, R.W., Bradshaw, J.G., Perlman, A.J. and Hoffman, A.R. (1989)  
Developmental and hormonal regulation of glucocorticoid receptor messenger RNA in the rat.  
J. Clin. Invest., 84:1843-1848.
26. Kamoun, A. (1970)  
Activité cortico-surrénale au cours de la gestation, de la lactation et du développement pré et postnatal chez le rat. I. Concentration et cinétique de disparition de la corticostérone.  
J. Physiol., 62:5-32.

27. Kaung, H.C. (1994)  
Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat.  
Dev. Dyn., 200:163-175.
28. Lacy, P.E. and Greider, M.H. (1979)  
Anatomy and ultrastructural organization of pancreatic islets.  
In: De Groot, L.J., Odell, W.D., Martini, L. et al. (eds):  
Endocrinology. vol. 2. New York, Grune & Stratton, pp 907-919.
29. Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature(Lond.), 227:680-685.
30. LaFond, R.E., Kennedy, S.W., Harrison, R.W. and Villee, C.A. (1988)  
Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptors in cells, cytoplasts, and nucleoplasts.  
Exp. Cell Res., 175:52-62.
31. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951)  
Protein measurement with the follin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 193:265-275.
32. Lu, R.B., Lebenthal, E. and Lee, P.C. (1987)  
Developmental changes of glucocorticoid receptors in the rat pancreas.  
J. Steroid Biochem., 26:213-218.



33. Matthes, H., Kaiser, A., Stier, U., Riecken, E.O. and Rosewicz, S. (1994)  
Glucocorticoid reseptor gene expression in the exocrine and endocrine rat pancreas.  
Endocrinology, 135:476-479.
34. McEvoy, R.C. and Madson, K.L. (1980)  
Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation.  
Biol. Naonate, 38:248-254.
35. McEvoy, R.C. (1981)  
Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat.  
Diabetes, 30:813-817.
36. McEvoy, R.C. and Hegre, O.D. (1976)  
Foetal rat pancreas in organ culture. Effects of media supplementation with various steroid hormones on the acinar and islet components.  
Differentiation, 6:105-111.
37. McEvoy, R.C., Hegre, O.D. and Lazarow, A. (1976)  
Foetal rat pancreas in organ culture. Effect of corticosterone concentrations on the acinar and islet cell components.  
Differentiation, 6:17-26.
38. McEvoy, R.C. (1980)  
Fetal and neonatal rat pancreas in organ culture: age-related effects of corticosterone on the development of the islet cells.  
Am. J. Anat., 157:319-327.

39. McEvoy, R.C., Leung, P.E. and Goggins, J.A. (1981)  
Tissue culture of fetal rat islets: corticosterone promotes D  
cell maintenance and function.  
Endocrinology, 108:2277-2282.
40. McIntosh, N., Pictet, R.L., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M.  
(1977)  
The developmental pattern of somatostatin in the embryonic and  
fetal rat pancreas.  
Endocrinology, 101:825-829.
41. Meaney, M.J., Sapolsky, R.M., Aitken, D.H. and McEwen, B.S.  
(1985)  
[<sup>3</sup>H]Dexamethasone binding in the limbic brain of the fetal rat.  
Brain Res., 23:297-300.
42. Mills, E.S. and Topper, Y.J. (1970)  
Some ultrastructural effects of insulin, hydrocortisone and  
prolactine on mammary gland explants.  
J. Cell Biol., 33:482-486.
43. O'Donnell, D., Francis, D., Weaver, S. and Meaney, M.J. (1995)  
Effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on  
glucocorticoid receptor levels in rat brain tissue: a  
comparison between western blotting and receptor binding  
assays.  
Brain Res., 687:133-142.
44. Parsa, I., Marsh, W.H. and Fitzgerald, P. (1969)  
Pancreas acinar cell differentiation. I. Morphologic and  
enzymatic comparisons of embryonic rat pancreas and pancreatic  
anlage grown in organ culture.  
Am. J. Pathol., 57:457-487.

45. Pearse, A.G.E. and Polak, J.M. (1971)  
Neural crest origin of the endocrine polypeptide (APUD) cells of the gastrointestinal tract and pancreas.  
*Gut*, 12:783-788.
46. Pictet, R.L., Rall, L.B., Phelps, P. and Rutter, W.J. (1976)  
The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells.  
*Science*, 191:191-192.
47. Pictet, R. and Rutter, W.J. (1972)  
Development of the embryonic endocrine pancreas. *In*: Greep, R. O., Astwood, E. B., Steiner, D. F. and Freinkel, N. (eds):  
*Endocrinology*. Vol 1. Baltimore:Williams and Wilkins. pp 25-66.
48. Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H. and Rutter, W.J. (1972)  
An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas.  
*Dev. Biol.*, 29:436-467.
49. Plas, C., Chapeville, F. and Jacquot, R. (1973)  
Development of glycogen storage ability under cortisol control in primary cultures of rat fetal hepatocytes.  
*Dev. Biol.*, 32:82-91.
50. Rall, L.B., Pictet, R.L., Williams, R.H. and Rutter, W.J. (1973)  
Early differentiation of glucagon-producing cells in embryonic pancreas: a possible developmental role for glucagon.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:3478-3482.

51. Sugimoto, M., Tajima, K., Kojima, A. and Endo, H. (1974)  
Differential acceleration by hydrocortisone of the accumulation of epidermal structural proteins in the chick embryonic skin growing in a chemically defined medium.  
Dev. Biol., 39:295-307.
52. ten Cate, W-J.F., Curtis, L.M., Small, G.M. and Rarey, K.E. (1993)  
Localization of glucocorticoid receptors and glucocorticoid receptor mRNAs in the rat cochlea.  
Laryngoscope, 103:865-871.
53. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76:4350-4354.
54. Wells, L.J., Erlandsen, S.L. and Eguchi, Y. (1968)  
Development of pancreases and adrenals of rat embryos in organ culture.  
Anat. Rec., 160:201-206.
55. Yamamoto, K.R. (1985)  
Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks.  
Annu. Rev. Genet., 19:209-252.
56. Yoon, H. and Lee, P. (1992)  
Autologous regulation of pancreatic glucocorticoid receptors in suckling rats.  
Pancreas, 7:226-232.

57. Yoshinari, M. and Daikoku, S. (1982)  
Ontogenetic appearance of immunoreactive endocrine cells in rat  
pancreatic islets.  
Anat. Embryol., 165:63-70.
58. Zagury, D. (1959)  
La culture de pancréas endocrine chez le rat et  
l'insulinogénèse.  
C. R. Acad. Sci., 249:2834-2835
59. Zagury, D. (1961)  
Contribution a l'étude morphologique des sécrétions  
pancréatiques.  
Ann. Sci. Nat., 3:13-296
60. Zarrow, M.X., Philott, J.E. and Denenberg, V.H. (1970)  
Corticosterone passes from mother to young through placenta.  
Nature(Lond.), 226:1058-1059.
61. 小川和朗、鈴木昭男、清寺 眞、永野俊雄、橋本一成、橋本正淑、山田英智、山  
元寅男、渡辺陽之輔編集。(1987)  
人体組織学4、消化器、朝倉書店、東京